

**Vergleichende Untersuchungen zu der
klassischen intravenösen versus
der intramedullären Transplantation
hämatopoetischer Stammzellen
im allogenen Hundemodell**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Juliane Werner, geb. am 12.08.1986 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 01.02.2016

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Junghanß
Zentrum für Innere Medizin,
Klinik III – Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder
Institut für Biowissenschaften
Abteilung für Genetik
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 1. Februar 2016

Datum der Verteidigung: 24. Juni 2016

"Das Leben ist zu kurz, um ein langes Gesicht zu machen."

Nossrat Peseschkian
1933 - 2010

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die hämatopoetische Stammzelle	2
1.2 Die Biologie der hämatopoetischen Stammzellnische	3
1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	6
1.3.1 Ein ausgewähltes Therapieverfahren der Hämatologie und Onkologie	6
1.3.2 Klinische Herausforderung: Transplantate mit limitierter Zellzahl	9
1.3.3 Ein innovativer Ansatz zur Verbesserung des Transplantatanwachsens: die intramedulläre Transplantation.....	12
2 ZIELSTELLUNGEN	14
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Präklinisches Hundemodell.....	18
3.2 MHC-Typisierung der Geschwisterhunde.....	18
3.3 Konditionierung des Empfängers	20
3.4 Knochenmarkentnahme für die HSZT.....	20
3.5 Transplantataufarbeitung.....	22
3.6 Transplantation der HSZ	23
3.6.1 Intravenöse Infusion	23
3.6.2 Intramedulläre Infusion	23
3.7 Chimärismusanalyse: Nachweis des Transplantatanwachsens nach allogener HSZT ...	24
3.7.1 Isolierung der PBMC und Granulozyten aus dem peripheren Blut	24
3.7.2 Isolierung des Knochenmarks.....	25
3.7.3 DNA-Extraktion	25
3.7.4 Agarosegelelektrophorese.....	26
3.7.5 VNTR-Analyse: PCR-Untersuchung spezifischer Minisatelliten.....	26
3.8 Durchflusszytometrie.....	28
3.8.1 Analyse der zellulären Transplantatzusammensetzung.....	29
3.8.2 Analyse der leukozytären Subpopulationen.....	30
3.9 Verlaufsuntersuchungen	31
3.9.1 Klinischer Status des Hundes in der Posttransplantationsphase	31

3.9.1.1 Physiologische Parameter	32
3.9.1.2 Überprüfung der Laborparameter	32
3.9.2 Probenentnahme für die Diagnostik	32
3.9.2.1 Blutentnahme	32
3.9.2.2 Knochenmarkentnahme	33
3.9.3 Bluttransfusion	33
3.10 Versuchstiere	33
3.11 Statistik	34
4 ERGEBNISSE	35
4.1 Charakteristika der Empfänger und Spender	35
4.2 Charakterisierung der Stammzelltransplantate	36
4.3 Allgemeines Überleben nach allogener HSZT: IV versus IBM	38
4.4 Kinetik der hämatopoetischen Regeneration	38
4.4.1 Regeneration der Thrombozyten (d-1 bis d+56)	40
4.4.2 Regeneration der Leukozyten (d-1 bis d+56)	42
4.4.3 Regeneration der leukozytären Subpopulationen (d-1 bis d+112)	43
4.4.4 Regeneration der Erythropoese (d-1 bis d+112)	47
4.5 Entwicklung des Spenderchimärismus in den verschiedenen Blutkompartimenten	48
4.6 Einfluss der Transplantatzusammensetzung auf den Grad des Spenderchimärismus ..	52
4.7 Therapieassoziierte Toxizität	56
4.7.1 Klinischer Verlauf der frühen Posttransplantationsphase (d-1 bis d+35)	57
4.7.2 Klinischer Verlauf der späten Posttransplantationsphase (bis d+112)	59
4.7.3 Einzelfallbetrachtung: GvHD-Reaktion in Hund 5 der IV-Gruppe	61
5 DISKUSSION	63
5.1 Hämatopoetische Regeneration	64
5.2 Chimärismusentwicklung	67
5.3 Toxizitäten und Komplikationen in der Posttransplantationsphase	69
5.4 Machbarkeit und Sicherheit der IBM-HSZT	71
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	74
7 LITERATUR	76
8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	86
9 DANKSAGUNG	88
10 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	90
11 ANHANG	91

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schema der normalen Hämatopoese	2
Abbildung 2:	Schematischer Aufbau der hämatopoetischen Stammzellnische.....	3
Abbildung 3:	Konditionierungsverfahren der allogenen HSZT beim Menschen	7
Abbildung 4:	Schema der Regeneration der Leukozytenwerte nach der Applikation von Transplantaten mit geringer versus ausreichender HSZ-Zellzahl	10
Abbildung 5:	Schema des Migrationsverhaltens der HSZ nach IV- und IBM-Applikation ...	12
Abbildung 6:	Transplantationsmodell	17
Abbildung 7:	Entnahme des Knochenmarks und Überführung in den Transplantations- beutel	21
Abbildung 8:	Buffy-Coat Präparation aus dem Knochenmarkblut	22
Abbildung 9:	Schematische Aufarbeitung des Knochenmarks für die IV- und IBM-HSZT ...	23
Abbildung 10:	IBM-HSZT mittels Perfusoren in den <i>Humerus</i> und <i>Femur</i>	24
Abbildung 11:	Kapillarelektrophoretische Analyse zur Chimärismusbestimmung	28
Abbildung 12:	Regeneration der Hämatopoese nach der IV- und IBM-HSZT	39
Abbildung 13:	Hämatokritverlauf nach IV- und IBM-HSZT	42
Abbildung 14:	Veränderung des CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen nach allogener HSZT	44
Abbildung 15:	Veränderungen der Monozyten und B-Zellzahlen nach allogener HSZT	46
Abbildung 16:	Verlauf der Erythrozytenzellzahlen während der gesamten Posttransplantationsphase	47
Abbildung 17:	Entwicklung des Spenderchimärismus in den PBMC und Granulozyten nach IV- und IBM-HSZT	50
Abbildung 18:	Spenderchimärismus in Abhängigkeit von den TNC und CD34 ⁺ -Zellzahlen im Transplantat	53
Abbildung 19:	Spenderchimärismus in Abhängigkeit von den CD14 ⁺ - und CD3 ⁺ -Zellzahlen im Transplantat	55
Abbildung 20:	Veränderungen klinischer Parameter in der frühen Posttransplantations- phase	57
Abbildung 21:	Verlauf der Leberenzyme ALAT, ASAT und der AP über die Gesamtposttransplantationszeit.....	60
Abbildung 22:	Leukozyten- und Thrombozytenverlauf sowie Entwicklung des Spenderchimärismus des Hundes mit der GvHD-Reaktion	61
Abbildung 23:	Manifestation der GvHD-Reaktion	62
Abbildung 24:	Creatinin- und Harnstoffwerte der IV- und IBM-Gruppe in der frühen Posttransplantationsphase	91
Abbildung 25:	Gesamtverlauf von ALAT, ASAT und AP des Hundes mit GvHD-Reaktion	91

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primersequenzen für die MHC I und MHC II Regionen zur Typisierung der Hunde	19
Tabelle 2: Pipettierschema für einen 25 µl PCR Ansatz	19
Tabelle 3: PCR Programm zur Testung der MHC I und MHC II Gene	19
Tabelle 4: Pipettierschema für den 25 µl PCR-Ansatz der VNTR-Regionen.....	27
Tabelle 5: Cyclor Programm für die PCR der VNTR-Regionen	27
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper zur Transplantatanalyse	29
Tabelle 7: Übersicht der Antikörper zur CD4/CD8 Ratio Bestimmung	30
Tabelle 8: Übersicht der erhobenen Parameter und deren Graduierung zur Bewertung des klinischen Status	31
Tabelle 9: Übersicht der gemessenen Laborparameter für die gesamte Posttransplantationsphase.....	32
Tabelle 10: Charakteristika der transplantierten Hunde	35
Tabelle 11: Auflistung der zellulären Zusammensetzung der verwendeten Transplantate....	37
Tabelle 12: Thrombozyten: Dauer der Zytopenie und Zeitpunkt der Regeneration	40
Tabelle 13: Anzahl der Bluttransfusionen während der frühen Posttransplantationsphase ..	41
Tabelle 14: Leukozyten: Dauer der Zytopenie und Zeitpunkt der Regeneration	43
Tabelle 15: Übersicht der Referenzwerte der untersuchten leukozytären Subpopulationen	43
Tabelle 16: Spenderchimärismus in der sehr frühen und späteren Posttransplantationsphase 48	
Tabelle 17: Übersicht der gemessenen CsA-Talspiegel (d-1 bis d+35)	59
Tabelle 18: Liste der verwendeten Forward und Reverse Primer inklusive der Sequenzen (5'zum 3' Ende, Forward Primer ist FAM markiert) für verschiedene canine VNTR-Regionen.....	92
Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer	93
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung.....	93
Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Geräte	94
Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	94
Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Antikörper	95
Tabelle 24: Übersicht der verwendeten Kits und Enzyme	95
Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten Medizinprodukte	96
Tabelle 26: Liste angewendeter Medikamente	97
Tabelle 27: Liste der Referenzwerte der Blut- und Laborparameter.....	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.....	destilliertes Wasser
CD	Cluster of differentiation
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung
CsA.....	Cyclosporin A
DLA	Hunde Leukozyten Antigen (engl. dog leukocyte antigen)
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FACS.....	Durchflusszytometer (engl. fluorescence activated cell sorting)
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtstreulicht (engl. forward side scatter)
GvHD.....	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. graft-versus-host disease)
Gy.....	SI-Einheit für Strahlungsdosis
HLA	Humanes Leukozyten Antigene
HSZ.....	Hämatopoetische Stammzelle
HSZT.....	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IBM	intramedullär (engl. intra-bone marrow)
IV.....	intravenöse Kontrollgruppe
I.E	internationale Einheiten
i.m.....	intramuskulär
KGW.....	Körpergewicht
Max.....	Maximum
MHC.....	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
Min	Minimum
NaCl	Natriumchlorid
NB	Nabelschnurblut
PBMC.....	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PET-CT.....	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
SSC	Seitwärtstreulicht (engl. side scatter)
SZ	Stammzellen
TNC	Gesamtzahl nukleärer Zellen (engl. total nucleated cells)
TBI.....	Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation)
VNTR.....	Minisatelliten (engl. variable number of tandem repeats)

1 EINLEITUNG

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist ein wesentlicher Therapiebestandteil maligner hämatologischer Erkrankungen. Der Erfolg der HSZT hängt neben der Grunderkrankung von zahlreichen transplantationsassoziierten Faktoren ab. Diese umfassen unter anderem die Intensität der Konditionierung, die Transplantatzusammensetzung als auch die Anzahl infundierter hämatopoetischer Stammzellen (HSZ). Während sowohl die Konditionierung als auch die Transplantatzusammensetzung modifizierbar sind, stellt die Verfügbarkeit geringer HSZ-Zellzahlen ein fortwährendes klinisches Problem dar. Nach konventioneller intravenöser (IV) Transplantation gelangt nur ein geringer Anteil der HSZ in das Knochenmark, um dort die Hämatopoese zu rekonstruieren. Die direkte intramedulläre (engl. intra bone marrow, IBM) Transplantation der HSZ in das Knochenmark stellt einen innovativen Lösungsansatz dar, den es bezüglich seiner Durchführbarkeit und seiner Effekte zu evaluieren gilt.

1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Der Prozess der Hämatopoese wird durch die pluripotente SZ realisiert. Zu den ersten Entstehungsorten der Blutbildung zählt in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung der Dottersack. Später übernimmt kurzzeitig die fetale Leber die Funktion als blutzellbildendes Organ [1]. Dies verändert sich im Laufe der Entwicklung dahingehend, dass letztendlich bei Erwachsenen die Hämatopoese sowohl im Knochenmark der Wirbelkörper, der Rippen, des Sternums, des Schädels, des Kreuzbeins und des Beckenknochens, als auch in den proximalen Enden des *Femur* und des *Humerus* stattfindet [2–5]. Die HSZ wird im Knochenmark von speziellen Strukturen, den HSZ-Nischen, geschützt und ist durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung [4] und Ausdifferenzierung gekennzeichnet [5]. Sie kann als pluripotente HSZ zum einen in alle Blutzellen ausreifen und zum anderen behält nach der Teilung mindestens eine Tochterzelle die Potenz und Fähigkeiten der Mutter-HSZ (siehe Abbildung 1) [6,7].

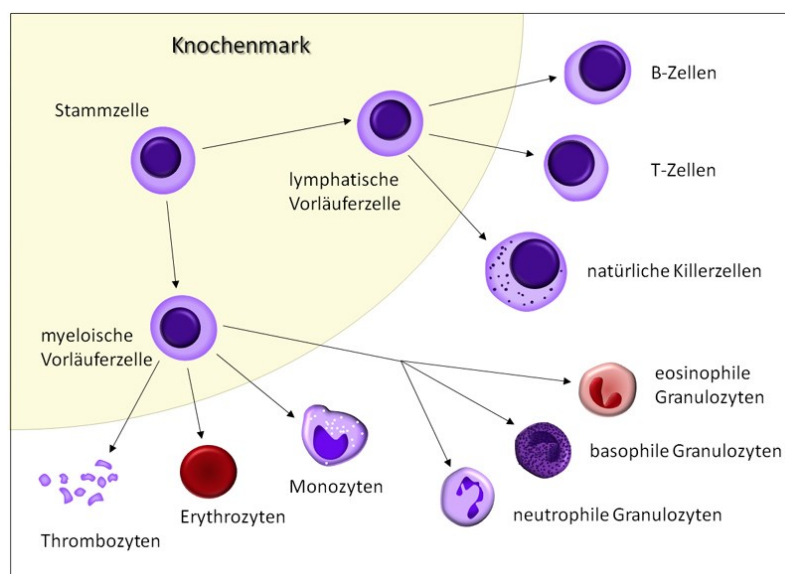


Abbildung 1: Schema der normalen Hämatopoese

Die Entwicklung von Blutzellen aus der HSZ findet im Knochenmark statt. Durch Teilung entstehen Vorläuferzellen, die in zwei Linien von Blutzellen unterschieden werden: die myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen. Nach weiteren Stufen der Differenzierung und Reifung entwickeln sich aus diesen Vorläuferzellen die verschiedenen Typen von reifen Blutzellen [8].

Immunphänotypisch ist die HSZ durch die Oberflächenantigene CD34+ und C-Kit beschrieben [1,9]. Eine der wichtigsten Aufgaben der HSZ ist die kontinuierliche Neubildung der Blutzellen. Zur Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im Blut, kann sie verschiedene Zustände wie Selbsterneuerung, Ausdifferenzierung, Seneszenz oder den Zelltod einnehmen [10]. Ist die

Balance gestört, können maligne hämatologische Erkrankungen entstehen, die beispielsweise bei akuten Leukämien eine ungebremsste Vermehrung der Progenitorzellen zur Folge haben [11]. Ein gegensätzliches Beispiel ist die aplastische Anämie, die durch ein Knochenmarkversagen mit Panzytopenie gekennzeichnet ist und somit mit einer verminderten Bildung der Blutzellen einhergeht. Als kurativer Ansatz solcher malignen hämatologischen Erkrankungen nimmt die HSZ selbst und ihre Nische im Rahmen der allogenen HSZT eine wesentliche Rolle ein [12].

1.2 Die Biologie der hämatopoetischen Stammzellnische

Die HSZ-Nische ist eine spezialisierte Architektur des Knochenmarks, in der die HSZ geschützt residieren und mit ihrer Zellumgebung interagieren können. Sie wird als dynamische Mikroumgebung beschrieben und unterteilt sich in eine osteoblastische und vaskuläre Region (siehe Abbildung 2) [13–17].

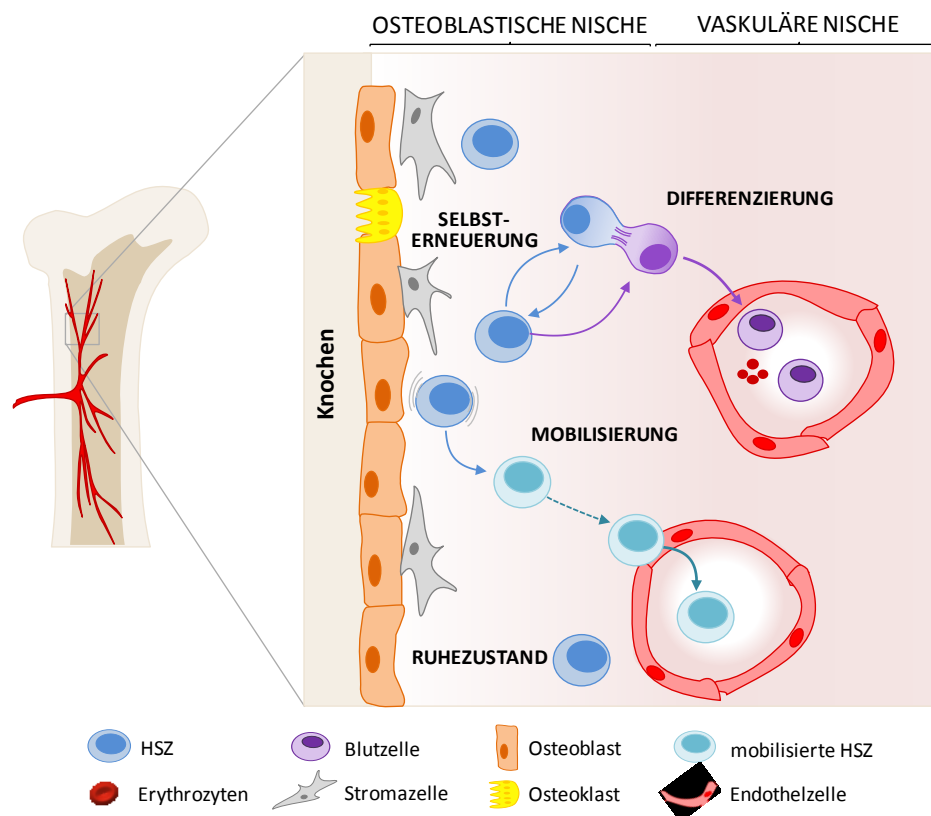


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der hämatopoetischen Stammzellnische

Die HSZ-Nische unterteilt sich in eine osteoblastische und vaskuläre Nische. Zellen wie Osteoblasten, -klasten und Stromazellen kleiden die osteoblastische Nische aus. Die vaskuläre Region ist durch Endothelzellen und Blutzellen gekennzeichnet. In dieser Mikroumgebung kann die HSZ die Funktionen der Selbsterneuerung, Differenzierung und Mobilisierung durchführen sowie im Ruhezustand vorliegen (Abbildung nach [18] modifiziert).

Der Begriff der HSZ-Nische wurde erstmals von Schofield et al. 1978 postuliert [19]. Sie konnten den Nachweis erbringen, dass HSZ aus der Milz nicht dasselbe proliferative Potenzial aufweisen wie die HSZ des Knochenmarks. Die ermittelten Ergebnisse ließen vermuten, dass die Zellumgebung des Knochenmarks Eigenschaften aufzeigt, welche die HSZ benötigt, um ihre vollständige Aktivität auszuüben. Heute ist bekannt, dass eine komplexe Interaktion zwischen zahlreichen Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, proteolytischen Enzymen, Stromazellen und der HSZ für die regulatorischen Mechanismen in der HSZ-Nische verantwortlich sind [20,21]. Besonders die gezielte Einwanderung der HSZ in die HSZ-Nischen des Knochenmarks, das sogenannte Ansiedeln (Homing), ist Voraussetzung für den reibungslosen und effektiven Ablauf nachgeschalteter Prozesse wie Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung der HSZ [22].

Das Gleichgewicht zwischen Ruhezustand und Selbsterneuerung wird durch intrinsische und extrinsische Faktoren in der Nische kontrolliert [7,23]. Des Weiteren spielen auch unterschiedliche Signalwege wie z. B. Notch, Jagged-1 und WNT für diese Prozesse eine ebenso wichtige Rolle [24–26]. Beispielsweise wird angenommen, dass die Osteoblasten durch die Interaktion mit dem Adhäsionsprotein N-Cadherin einen direkten Einfluss auf die HSZ-Funktion ausüben [18].

Zudem wird den Osteoblasten eine wesentliche Bedeutung zur Erhaltung des Ruhezustandes der HSZ zugeschrieben. Dies wird durch die Produktion von Osteopontin gesteuert, welches die Expansion der HSZ limitiert [27]. Darüber hinaus regulieren Proteine wie Agiopoetin-1 und Thrombopoetin, durch die Bindung an spezielle Rezeptoren, den Zellzyklus, in dem sie diesen verlangsamen oder blockieren [28,29]. Das Homing der Zellen wird durch weitere zahlreiche Prozesse, in die unter anderem der stroma-derived factor (SDF)-1 eingebunden ist, koordiniert [30]. Dieser Faktor wird besonders stark in Osteoblasten, Endothelzellen und retikulären Zellen exprimiert und ist an der Kontrolle der Zelladhäsion, des Zellüberlebens und des Zellzyklus beteiligt [31].

Im vaskulären Teil der HSZ-Nische steuern die Sinusoiden und Endothelzellen die Prozesse der Differenzierung, Proliferation und Mobilisierung der HSZ [32–34]. Die gebildeten Progenitorzellen können in der vaskulären Nische weiter reifen und durch die räumliche Nähe zu Sinusoiden sofort in die Blutbahn migrieren.

In den letzten Jahrzehnten konnten die Kenntnisse über die komplexen Prozesse in der HSZ-Nische sukzessiv erweitert und ihre Relevanz für die HSZ-Funktionalität bestätigt werden [35,36]. Somit rückt die HSZ-Nische zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung, um z.B. neue therapeutische Ansätze im Rahmen einer HSZT zu entwickeln. Aufgrund der Tatsache, dass das Ansiedeln der HSZ ausschlaggebend für ein erfolgreiches Transplantatanwachsen ist, liegt besonders die Identifizierung neuer Mechanismen des HSZ-Homings im Zentrum aktueller Forschung. Untersuchungen belegen, dass sich die HSZ im Normalzustand in der Nähe des Endothels der Sinusoiden und der endostalen Region befinden. Erfolgt im Zuge einer HSZT die Konditionierung kommt es zu Veränderungen in der HSZ-Nische. So zeigte sich, dass HSZ nach der Schädigung des Knochenmarks beginnen zu expandieren und vermehrt an die endostale Oberfläche des Knochens migrieren [37,38]. Auslöser für dieses Verhalten könnte die Expression des Chemokins SDF-1 in der inneren Knochenhaut (Endost) sein [39].

Insbesondere für die HSZ-Transplantation mit geringer HSZ-Anzahl wie z. B. Nabelschnurblut, ist die Charakterisierung der komplexen Abläufe in der HSZ-Nische von großer Bedeutung. Bekannterweise führt eine verminderte Zellzahl im Transplantat zu einer verlängerten Zeit bis zur Regeneration der Neutrophilen nach HSZT und stellt somit ein erhöhtes Risiko für Infektionen dar [40–43]. Weiterhin geht durch die konventionelle Gabe über die Vene bei der HSZT ein Großteil an HSZ in periphere Organe verloren und stirbt ab [44]. Um Einfluss auf das Homing nehmen zu können, ist demzufolge schon die Modifizierung der Applikationsform ein wichtiger Aspekt. Auf diese Weise könnten schwache Transplantate effizienter zur HSZ Nische gelangen.

1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

1.3.1 Ein ausgewähltes Therapieverfahren der Hämatologie und Onkologie

Die allogene HSZT stellt für viele maligne hämatologische Erkrankungen die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar. Allein im Jahr 2013 wurden in Europa insgesamt 39.209 HSZT durchgeführt [45]. Davon erfolgten 43 % allogene und 57 % autologe. Zu den Hauptindikationen zählen die Leukämien mit einem Anteil von 32 % und die Gruppe der lymphoiden Neoplasien mit 57 % [45]. Aber auch nicht maligne hämatologische Erkrankungen können mit einer HSZT therapiert werden.

Für die allogene HSZT werden genetisch unterschiedliche (d. h. allogene) Individuen der gleichen Spezies verwendet. Voraussetzung für diese Form der Transplantation ist allerdings eine Übereinstimmung von Spender und Empfänger in spezifischen Gewebemerkmalen, den Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. major histocompatibility complex, MHC), um Abstoßungsreaktionen vorzubeugen oder die Entwicklung einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. graft versus host disease, GvHD) zu vermeiden. Die MHC Komplexe sind Proteine, welche die Zellen immunologisch charakterisieren und in drei Klassen eingeteilt werden. Bei Wirbeltieren sind für die Immunabwehr die MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Proteinkomplexe von Bedeutung. Beim Menschen werden diese Komplexe auch als Humane Leukozyten-Antigene (HLA) bezeichnet. Zentraler Punkt bei der Suche nach einem Spender für die Transplantation ist daher die genaue Charakterisierung der HLA-Regionen potenzieller Spender und Empfänger. Zu HLA-Klasse-I Molekülen zählen die Isotypen HLA-A, -B und -C. Sie sind für die Antigenpräsentation gegenüber den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) verantwortlich. Die HLA-Klasse II Isotypen werden wiederum als HLA-DR, -DQ, und -DP bezeichnet. Sie präsentieren die Antigene den T-Helferzellen (CD4⁺). Dies ist für die allogene HSZT von entscheidender Bedeutung. Je unterschiedlicher die HLA-Merkmale von Empfänger und Spender sind, desto stärker ist die Immunreaktion.

Das Verfahren der allogenen HSZT beim Menschen umfasst eine als Konditionierung bezeichnete Vorbehandlung des erkrankten Patienten durch Chemo- und/oder Strahlentherapie. Die Ziele der Konditionierungstherapie sind (1) die Reduktion der Tumormasse, um das Risiko eines Rezidives zu minimieren, (2) die Immunsuppression des Patienten (Empfänger), um ein Anwachsen des Transplantates zu gewährleisten und (3) die

Myeloablation des Knochenmarks, damit die Spender-HSZ sich in der HSZ-Nische ansiedeln und die neue Blutbildung übernehmen können.

Im Laufe der Jahrzehnte haben sich grundsätzlich zwei verschiedene Konditionierungsverfahren etabliert. Hierbei handelt es sich zum einen um die myeloablativen (knochenmarkzerstörend) und zum anderen um die neueren toxisitätsreduzierten bzw. nicht-myeloablativen Konditionierungsverfahren (siehe Abbildung 3. Die myeloablative Konditionierung, welche in der Regel auf reinen Chemotherapie Protokollen und/oder einer hochdosierten Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation, TBI) (8-14 Gy) basiert, führt zu einer raschen und vollständigen Eliminierung der Empfänger-Hämatopoese (siehe Abbildung 3) [46]. Nebenwirkungen, dieser aggressiven Art der Therapie, manifestieren sich in einer hohen behandlungsassoziierten Morbiditäts- und Mortalitätsrate. So ist nach myeloablativer HSZT mit einer langen Phase der Neutropenie (Anzahl neutrophiler Granulozyten $< 0,5 \times 10^9/l$) zu rechnen, die zu einem Anstieg des Infektionsrisikos führt.

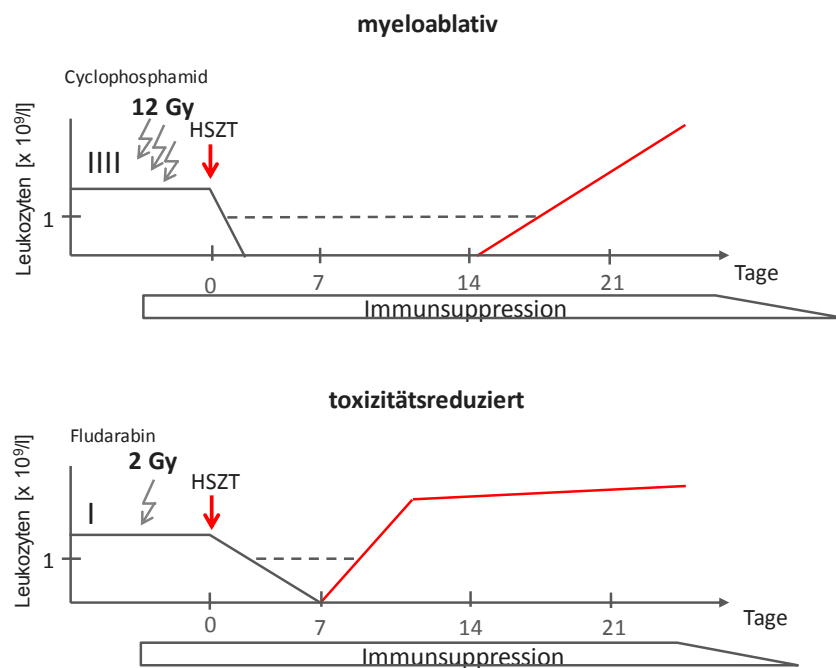


Abbildung 3: Konditionierungsverfahren der allogenen HSZT beim Menschen

Es existieren im humanen Bereich zwei unterschiedliche Konditionierungsverfahren für die allogene HSZT. Das myeloablative Standardprotokoll beinhaltet eine hochdosierte TBI mit 12 Gy kombiniert mit der Gabe des Zytostatikums Cyclophosphamid und anschließender Immunsuppression. Diese Form der Konditionierung ist mit einer stark verzögerten Regeneration der Leukozyten (rote Linie) assoziiert. Wohingegen toxisitätsreduzierte Konditionierungsregime, aus niedrigdosierter 2 Gy TBI, Fludarabin und nachfolgender Immunsuppression, eine kürzere Phase der Leukozytopenie zur Folge haben [47,48].

Demgegenüber stehen die toxisitätsreduzierten und nicht-myeloablativen Konditionierungsverfahren bestehend aus niedrigdosierter Chemo- oder Strahlentherapie. Ziel dieser Verfahren ist die Reduktion der knochenmarktoxischen Wirkung bei gleichzeitiger Erhaltung der immunsuppressiven Wirkung, um ein Transplantatanwachsen bei verringerter Toxizität zu erreichen [49]. Die Vorteile dieser Therapie liegen in einem verbesserten Nebenwirkungsprofil mit einer kürzeren Phase der Neutropenie und einer schnelleren Wiederherstellung der Hämatopoese. Die Nachteile sind die erhöhten Rezidivraten der Grunderkrankung.

Die allogene HSZT ist mit zahlreichen Komplikationen verbunden. Die zwei häufigsten Komplikationen sind Infektionen und die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. graft-versus-host-disease, GvHD).

Infektionen treten vor allem in der Phase der Neutropenie auf, welche durch die vorangegangene Konditionierung und die nachfolgende Immunsuppression ausgelöst wird. Der Patient ist in dieser Zeit sehr anfällig für eine Akquisition und Reaktivierung von Infektionserkrankungen [50], da die Barrieren des Immunsystems problemlos überwunden werden können [51]. Ein weiteres Phänomen nach einer HSZT ist die GvHD, welche als eine immunologische Reaktion immunkompetenter Spenderzellen des Transplantates gegen Körperzellen des Empfängers definiert ist [52]. Die Zielorgane einer GvHD sind neben dem Immunsystem und der Hämatopoese die Leber, die Haut und der Darm. Im Allgemeinen wird die GvHD nach einer HSZT in 20-50 % der Fälle leicht bis mild und in 10 % schwer ausgeprägt [53,54]. Neben den negativen Auswirkungen auf gesundes Gewebe, bewirkt die Immunreaktion gegen den Empfängerorganismus einen gewünschten kurativen Transplantat-gegen-Leukämie (engl. graft-versus-leukemia, GvL) -Effekt. Der therapeutische Nutzen für den Patienten aus dieser Immunantwort basiert auf einer schrittweisen Eliminierung nicht nur der gesunden HSZ des Empfängers, sondern gleichzeitig auch der malignen Leukämie- bzw. Lymphomzellen [55,56]. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit einer GvHD ein geringeres Risiko für ein Rezidiv aufwiesen als diejenigen ohne GvHD. Daher kann eine milde Form der GvHD den Therapieerfolg der HSZT unterstützen [56], [57].

Als HSZ-Quelle werden für die allogenen HSZT vornehmlich peripheres Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut verwendet [58,59], wobei HSZ aus dem peripheren Blut die am häufigsten genutzte Quelle darstellt. Knochenmark und Nabelschnurblut werden hingegen nur in 22 % bzw. 5,7 % der Fälle transplantiert, allerdings mit steigender Tendenz [60]. Zur

HSZ-Gewinnung aus dem peripheren Blut wird dem Spender der Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (G-CSF) subkutan appliziert. Dieses Wachstumshormon bewirkt ein Ausschwemmen von pluripotenten HSZ aus dem Knochenmark ins periphere Blut wodurch sich der normale Anteil an HSZ im Blut von ca. 0,05 % auf ca. das Hundertfache steigert [50,61]. Anschließend werden durch eine sogenannte Leukapherese die HSZ gewonnen [6]. Zur Gewinnung der HSZ direkt aus dem Knochenmark werden dem Spender 10 ml/kg Körpergewicht (KGW) des Empfängers Knochenmarkblut entnommen. Ziel ist es mindestens $2,0 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen/kg KGW zu transplantieren, um die Regeneration der Hämatopoese zu gewährleisten [62]. Als eine weitere HSZ-Quelle kann das Nabelschnurblut dienen. Jedoch ist die erzielte minimale Gesamtmenge mit einer geringen absoluten HSZ-Anzahl verbunden.

Im Anschluss an die HSZ-Gewinnung erfolgt die Transplantation der HSZ über die Vene. Die IV-Gabe hat sich mit der ersten erfolgreichen HSZT im Menschen in der Routine aufgrund ihrer Einfachheit durchgesetzt [63] und ist auch bis heute ein fester Bestandteil der Therapie.

1.3.2 Klinische Herausforderung: Transplantate mit limitierter Zellzahl

Die sofortige Verfügbarkeit eines passenden HSZ-Spenders ist trotz 25 Millionen registrierter Spender weltweit nicht in dem erforderlichen Maße gegeben [64]. Wartezeiten von ca. 3-4 Monaten, bedingt durch die Zeit der Identifikation, Typisierung und Ernten der HSZ vom Spender bis hin zur Transplantation der Zellen, überleben die Patienten zumeist nicht. Deshalb wurde in den letzten zehn Jahren nach einer alternativen Stammzellquelle gesucht. Die Verwendung von HSZ aus dem Nabelschnurblut rückte in diesem Zusammenhang immer mehr in den Fokus der Forschung.

Der Nutzen von HSZ aus dem Nabelschnurblut, gegenüber HSZ aus dem Knochenmark oder peripheren Blut für die HSZT, liegt zum einen in dem noch immunologisch unausgereiften jungen Status der Zellen und zum anderen in der niedrigen Prävalenz von transplantationsrelevanten Viren im Transplantat. Dies resultiert in einem geringeren Risiko einer GvHD. Ein weiterer Vorteil ist die rasche Verfügbarkeit der eingefrorenen Transplantate. Deren Gewinnung erfolgt schmerzfrei und ohne ein gesundheitliches Risiko für Mutter und Kind [40]. Zusätzlich ist eine vollständige Gewebeverträglichkeit nicht zwingend erforderlich [65,66]. Die wesentliche Limitation dieser HSZ-Quelle liegt jedoch in dem geringen Anteil an

CD34⁺-HSZ pro Nabelschnurblut-Einheit. Bisher kann die Transplantation von Nabelschnurblut vorwiegend bei Kindern angewendet werden, da bezogen auf ihr geringes Körpergewicht eine einzelne Nabelschnurblut-Einheit ausreichend HSZ enthält, um eine Regeneration der neuen Hämatopoese zu initiieren [67].

Für erwachsene Patienten ist allerdings bekannt, dass die Transplantation von HSZ aus dem Nabelschnurblut, aufgrund der limitierten HSZ-Zellzahl ($\leq 2,0 \times 10^6$ CD34⁺/kg KGW) zu einer länger anhaltenden Phase der Leuko- und Thrombozytopenie führt, welches für den Patienten ein höheres Infektionsrisiko sowie eine verstärkte Blutungsneigung bedeutet (siehe Abbildung 4).

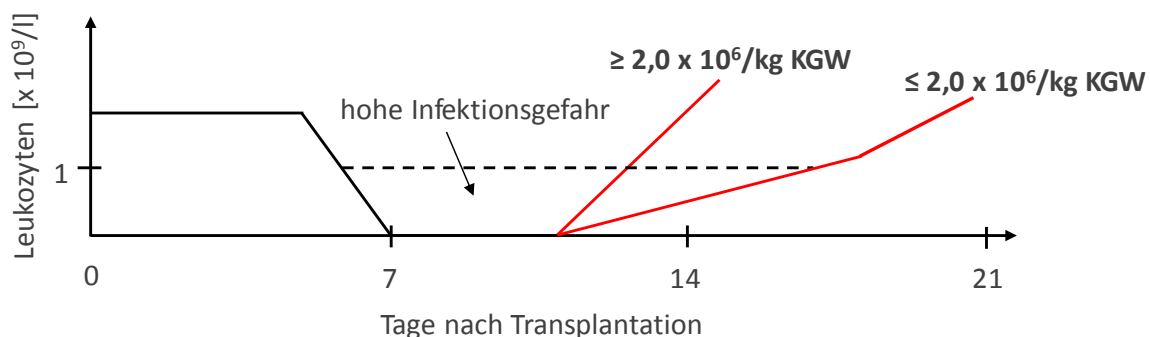


Abbildung 4: Schema der Regeneration der Leukozytenwerte nach der Applikation von Transplantaten mit geringer versus ausreichender HSZ-Zellzahl

Die Erholung der Leukozytenwerte nach der Applikation von geringen HSZ-Zellzahlen ($\leq 2 \times 10^6$ CD34⁺/kg KGW) setzt im Vergleich zu Transplantaten mit ausreichender HSZ-Zellzahlen ($\geq 2 \times 10^6$ CD34⁺/kg KGW) deutlich verzögert ein, sodass die Phase der Leukozytopenie länger andauert und somit das Infektionsrisiko für den Patienten wesentlich erhöht ist [62,68].

Deshalb wird auch heutzutage, im Hinblick auf das hohe Risiko für den Patienten, dieses Verfahren selten durchgeführt [69]. Jedoch belegen Studien, dass nach der Applikation zweier Nabelschnurblut-Einheiten gleichwertige Ergebnisse im Transplantatanwachsen, wie es mit HSZ aus dem Knochenmark oder peripheren Blut erreicht wird, erzielt werden [70]. Doch nicht nur Nabelschnurbluttransplantate sind mit geringen HSZ-Zellzahlen assoziiert, sondern auch zum Teil Transplantate von regulären Geschwister oder unverwandten Spendern (sogenannte „schlechte Mobilisierer“).

Die Herausforderung für die klinische Anwendung solcher „schwachen“ Transplantate im Bereich der HSZT liegt in der Beschleunigung der hämatopoetischen Regeneration und dem stabilen Transplantatanwachsen [71]. Hinzukommend ist bekannt, dass nach konventioneller IV-Applikation weniger als 15 % der infundierten Spender-HSZ ins Knochenmark des

Empfängers migrieren [44,72–74]. Die Mehrheit der Zellen akkumuliert in weiteren hämatopoetischen (Milz, Leber) sowie nicht-hämatopoetischen Organen (Lunge, Niere, Muskel, Herz) [75] und wirkt somit nicht an der Repopulation der Hämatopoese mit. Diese Zellen werden im Verlauf eliminiert bzw. sterben ab. Das Ansiedeln der IV-infundierten HSZ des Spenders im Knochenmark, insbesondere in den HSZ-Nischen des Empfängers, stellt eine kritische Voraussetzung für ein dauerhaftes Transplantatanwachsen und die Rekonstitution der Hämatopoese des Empfängers dar. Aus diesem Grund könnte eine effizientere Applikationsform der HSZ zur Optimierung des Transplantationsergebnisses, insbesondere bei Transplantaten mit geringer HSZ-Zellzahl, beitragen.

1.3.3 Ein innovativer Ansatz zur Verbesserung des Transplantatanwachsens: die intramedulläre Transplantation

Die Methode der IBM-HSZT bietet die Möglichkeit, Spender-HSZ direkt in das Knochenmark des Empfängers zu applizieren und damit gezielt in die räumliche Nähe der HSZ-Nische zu bringen. Dies sollte ein effizienteres Homing ermöglichen und die hohe Verlustrate ($> 85\%$) an HSZ durch die systemische Zirkulation nach IV-Applikation verringern (siehe Abbildung 5).

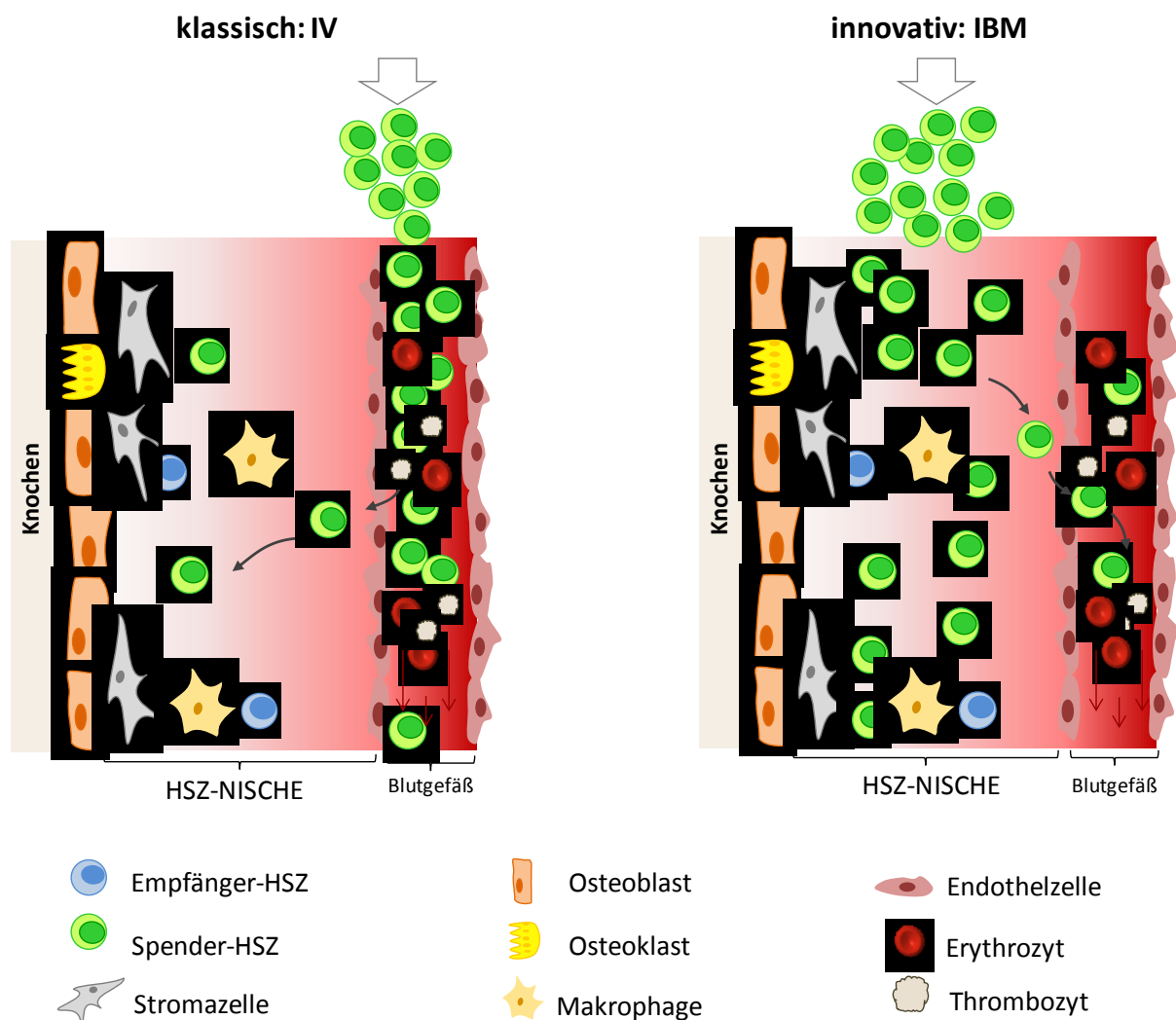


Abbildung 5: Schema des Migrationsverhaltens der HSZ nach IV- und IBM-Applikation

Die konventionelle Methode der IV-Infusion der HSZ führt zu einem erheblichen Zellverlust, sodass ein Großteil der Spender-HSZ nicht in das Knochenmark und damit nicht in die HSZ-Nische des Empfängers gelangt, sondern über die Blutbahn in periphere Organe migriert. Durch die IBM-Applikation erreichen mehr Spender-HSZ das Knochenmark, um sich effizienter in der HSZ-Nische des Empfängers anzusiedeln (eigene Darstellung).

Diese genannten Probleme könnten erfolgreich durch die IBM-HSZT umgangen werden, welches in präklinischen Versuchen bereits an Mäusen und Ratten belegt werden konnte [76–79]. Durch ein optimiertes Homing könnte insbesondere bei Transplantaten mit einem geringen HSZ-Anteil das Transplantatanwachsen verbessert werden. Hierfür stellt die IBM-Transplantation der HSZ eine geeignete Alternative zur IV-Applikation dar. Allerdings sind die präklinischen Untersuchungen zu dieser Alternativmethode bisher vornehmlich mit myeloablativen Konditionierungsverfahren getestet worden. Daten nach nicht-myeloablativer Konditionierung existieren ausschließlich für eine Studie im Hundemodell [80]. Dabei wurden ein initiales Anwachsen des Transplantates in jedem Tier und ein stabiler Langzeitchimärismus in 50 % der Tiere erzielt. Einen Vorteil bezüglich des Anwachsens ergab sich im nicht-myeloablativen Großtiermodell im Gegensatz zu myeloablativen Nagetierstudien nicht. Somit scheint der Einfluss des Grades der Myeloablation als auch der Applikationsform von wesentlicher Bedeutung. Die optimale Intensität der Konditionierungstherapie sollte ausreichend freie HSZ-Nischen schaffen, um ein erfolgreiches Homing der HSZ zu gewährleisten und gleichzeitig die Gesamtoxität für den Patienten geringhalten.

Insgesamt könnte die IBM-HSZT durch ein verbessertes Transplantatanwachsen zur Senkung der Mortalitäts- und Morbiditätsraten, speziell bei Patienten mit medizinischen Kontraindikationen (z.B. Alter, Gewicht) für eine konventionelle HSZT, beitragen. Darüber hinaus könnten Transplantate mit geringer HSZ-Zellzahl effizienter transplantiert werden.

2 ZIELSTELLUNGEN

Der Verlust der HSZ in periphere Organe nach konventioneller IV-HSZT ist ein klinisches Problem. Die IBM-HSZT als neue Applikationsform der HSZ hat in myeloablativen präklinischen Modellen einen Benefit in dieser Situation gezeigt. Daten im nicht-myeloablativen (2,0 Gy) Hundetransplantationsmodell haben keine Unterschiede bezüglich des Transplantatanwachsens feststellen können. Untersuchungen zu toxizitätsreduzierten Konditionierung ($> 2,0$ Gy und $\leq 5,0$ Gy TBI) existieren bislang nicht.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher im 4,5 Gy allogenen Hundetransplantationsmodell folgende Hypothesen überprüft werden:

1. „Die toxizitätsreduzierte Bestrahlung mit 4,5 Gy erhöht den Expansionsdruck auf die Posttransplantations-Hämatopoese des Empfängers und bewirkt, dass sich potenziell mehr Spender-HSZ in der HSZ-Nische ansiedeln können.“
2. „Der Anteil an Spender-HSZ, die die HSZ-Nische erreichen wird mithilfe der IBM-Methode deutlich erhöht, welches in der Folge im Vergleich zur IV-HSZT zu einer schnelleren Regeneration der Hämatopoese und zu einem höheren Spenderchimärismus führt.“

Hiermit ergeben sich als primäre Ziele:

- Überprüfung der Kinetik des Transplantatanwachsens (Regeneration der Leuko- und Thrombozyten)
- Überprüfung der Kinetik der Entwicklung des Spenderchimärismus
- Machbarkeit und Sicherheit der IBM-HSZT nach toxizitätsreduzierter Konditionierung im Hundemodell

und als sekundäre Ziele:

- Untersuchung des klinischen Verlaufs während der gesamten Posttransplantationsphase
- Untersuchungen zu dem Einfluss der Transplantataufarbeitung auf die Transplantatzusammensetzung

Hierzu werden insgesamt 15 voneinander unabhängige HSZT an 15 verschiedenen Hunden durchgeführt und jedes Tier über einen Zeitraum von 16 Wochen beobachtet. Eine Versuchsgruppe sollte nach der IBM-Methode transplantiert werden ($n = 7$) und eine

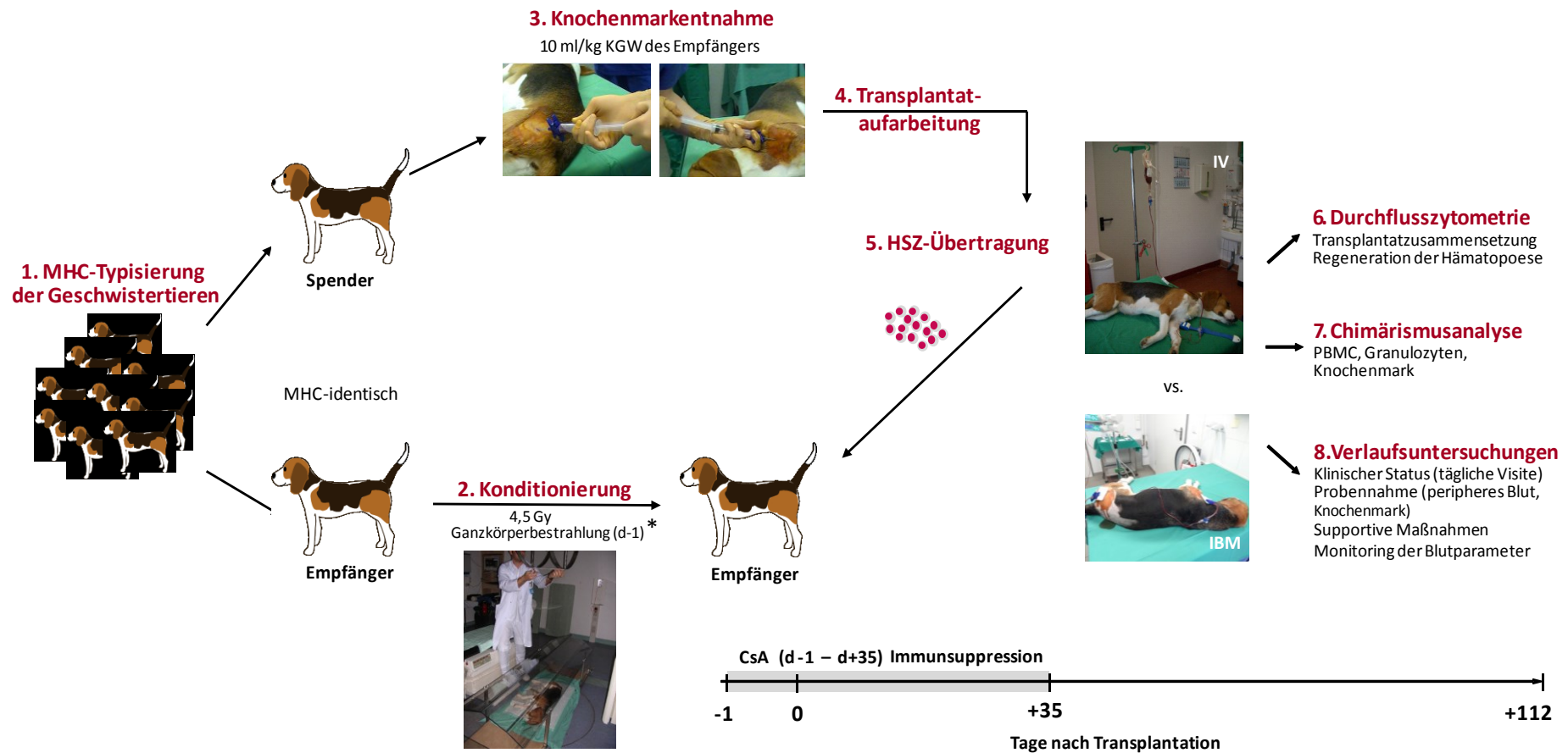
Zielstellungen

IV-transplantierte Kohorte (n = 7) dient als Kontrolle. Aussagen zur Transplantatzusammensetzung sowie der Regeneration der Hämatopoese erfolgen anhand durchflusszytometrischer Analysen. Des Weiteren findet eine Überprüfung des Transplantatanwachsens durch die Bestimmung des Spenderchimärismus mittels VNTR-Analyse statt. Darüber hinaus wird der klinische Status jedes Hundes über den gesamten Verlauf durch die regelmäßige Visite und Kontrolle verschiedenster Laborparameter evaluiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die allogene HSZT ist ein komplexes Therapieverfahren. Neben der eigentlichen Transplantation sind prä- und posttransplantationem weitere Maßnahmen erforderlich, um den Transplantationserfolg zu gewährleisten. In der Abbildung 6 sind die einzelnen Arbeitsschritte, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, als zusammenfassende Übersicht dargestellt. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden mit Assistenz von Tierpflegern der Zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Vollmar) und/oder Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christian Junghanß realisiert. Diese übernahmen sowohl unterstützende Tätigkeiten, wie das Festhalten der Tiere, das Zureichen von Materialien als auch die Dokumentation von Behandlungsabläufen. Eingriffe wie beispielsweise Blutentnahmen, Bluttransfusionen, Knochenmarkentnahmen, Knochenmarkinfusionen sowie Narkosen wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Als Grundlage für die Durchführung des Versuchsvorhabens musste zunächst die Typisierung von Hundewürfen erfolgen, aus denen die MHC I und II identischen Spender/Empfänger-Paarungen bestimmt wurden (Abbildung 6, Punkt 1). Im Anschluss daran erfolgte die eigentliche Transplantation. Hierfür wurden in einem Schritt die Konditionierung des Empfängerhundes sowie die Knochenmarkentnahme vom Spendertier durchgeführt (Abbildung 6, Punkte 2 und 3). Der Fokus der Arbeit lag hierbei auf der sich daran anschließenden Knochenmarkübertragung. Hierfür wurde das Knochenmark in einer Versuchsgruppe unmodifiziert als klassische IV-Infusion appliziert (IV-Gruppe) und in einer zweiten Versuchsgruppe als aufgearbeitetes Knochenmark in Form eines Buffy-Coat über 10 min simultan direkt in den *Humerus* und *Femur* (IBM-Gruppe) infundiert (Abbildung 6 Punkte 4 und 5). Parallel erfolgten durchflusszytometrische Analysen zur Transplantatzusammensetzung und der leukozytären Subpopulationen (Abbildung 6, Punkt 6). Der Spenderchimärismus und die Regeneration der Hämatopoese wurden durch regelmäßige Blutentnahmen kontrolliert (Abbildung 6, Punkt 7). Es wurden bedarfsgerechte supportive Maßnahmen unternommen und begleitende Untersuchungen zur Ermittlung der Toxizität der Transplantationsregime durchgeführt (Abbildung 6, Punkt 8).



*innerhalb von < 24 h vor der HSZT

Abbildung 6: Transplantationsmodell

Die einzelnen Arbeitspakete, die für diese vergleichenden Untersuchungen zur klassischen IV- und IBM-HSZT durchgeführt wurden umfassen die Histokompatibilitätsprüfung von Hundewürfen (Punkt 1), die Transplantation inklusive Entnahme und Übertragung des Knochenmarks (Punkt 2-5) und die anschließenden Analysen zur Bewertung des Transplantationserfolges beider Transplantationsregime (Punkt 6-8).

3.1 Präklinisches Hundemodell

Der Haushund (*canis familiaris*) wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich in der Forschung als Großtiermodell verwendet [81]. Zahlreiche Fragestellungen der Humanmedizin in den Bereichen Pharmakologie sowie Hämatologie und Onkologie [80,82–90] wurden bereits mit dem caninen Modell beantwortet. Insbesondere für die HSZT ist der Hund als präklinisches Tiermodell zur Entwicklung neuer Transplantationsstrategien etabliert.

Ein wesentliches Merkmal ist der Auszuchtcharakter des Hundes, welches eine genetische Variabilität repräsentiert und damit einer natürlichen Population entspricht, die dem Menschen sehr ähnelt. Des Weiteren sind Ähnlichkeiten hinsichtlich der Genetik, des Metabolismus, der Lebenserwartung von Blutzellen aber auch des Auftretens von Erkrankungen in Hund und Mensch vorhanden [91,92].

Neben diesen Gründen basiert die Wahl des Hundemodells vor allem auf den über 50 Jahre hinweg erlangten Erfahrungen in der Transplantationsimmunologie im Tiermodell des Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA), dessen Ergebnisse zu wesentlichen Fortschritten im Bereich der Knochenmarktransplantation geführt haben [83]. Die Fortschritte umfassten unter anderem die Entwicklung des nicht-myeloablativen Konditionierungsregimes sowie die Spenderlymphozyteninfusion am Hund, welche direkt in die klinische Anwendung übertragen werden konnten und bis heute fester Bestandteil der allogenen HSZT sind [93–95].

3.2 MHC-Typisierung der Geschwisterhunde

Für die allogene HSZT wurden in dieser Arbeit ausschließlich DLA-identische Geschwistertiere verwendet. Der Nachweis der DLA-Identität erfolgte über die Untersuchung der Pseudogene DLA-53 (MHC I) und DLA-DRB2 (MHC II) wobei eine Übereinstimmung dieser Gene zwischen Empfänger und Spender einer MHC I-/MHC II-Identität entspricht.

Für die Überprüfung der DLA-Kompatibilität wurden allen Tieren eines Hundewurfes jeweils 4 ml EDTA-Blut entnommen. Das Vollblut wurde in je ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 40 ml 0,25 M Erythrozyten-Lysepuffer (Ammoniumchlorid, NH_4Cl) für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 200 x g und 4 °C, Bremse 6 ab zentrifugiert und zwei Mal mit je 45 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zur Amplifizierung DLA-spezifischer DNA-Sequenzen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt. Dazu wurden Primerpaare verwendet, die es ermöglichen, die caninen Pseudogene DLA 53 (MHC I) und DLA-DRB2 (MHC II) zu

Material und Methoden

amplifizieren. Zur Detektion in der anschließenden Kapillarelektrophorese wurden fluoreszenzmarkierte Forward Primer (siehe Tabelle 1) verwendet.

Tabelle 1: Primersequenzen für die MHC I und MHC II Regionen zur Typisierung der Hunde

Primer	Sequenz	Pseudogen	Lokalisation
2200	5'-CAT GAT CCT GGA GTC CCG -3'	DLA-53 (MHC I)	Chromosom 12
	5'-GAA AGC TGC TTC AGT GGA CC -3'		
2202	5'-GTT GAG TGC TTG CCT TTA GC -3'	DLA-DRB2 (MHC II)	Chromosom 12
	5'-CAC GAT CTT CAT ATG TCA CC -3'		

Die DNA wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert. Das Pipettierschema der PCR für die MHC I und II kodierenden Gene ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Pipettierschema für einen 25 µl PCR Ansatz

Agens	MHC I	MHC II
10 x PCR Puffer	2,5 µl	2,5 µl
100 mM dNTPs	2,5 µl	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	0,5-1,0 µl	0,75 µl
50 pM Forward Primer	0,25 µl	0,25 µl
50 pM Reverse Primer	0,25 µl	0,25 µl
2,5 Unit Taq-Polymerase	0,1 µl	0,1 µl
Aqua dest.	ad 25 µl	ad 25 µl
50-100 ng/µl DNA	1,0-2,0 µl	1,0-2,0 µl

Parallel zu jeder PCR wurde außerdem eine Negativkontrolle, die Aqua dest. anstelle der Proben-DNA enthielt, mitgeführt. Die gewählten Einstellungen für das PCR-Programm sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: PCR Programm zur Testung der MHC I und MHC II Gene

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	1
94 °C	50 s	34
68 °C	50 s	
72 °C	50 s	
72 °C	5 min	1
4 °C		∞

Die amplifizierte DNA aller Tiere eines Wurfes wurde anschließend mittels Kapillarelektrophorese auf DLA-Kompatibilität untersucht. Das Grundprinzip der Kapillarelektrophorese beruht darauf, dass negativ geladene DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Ladung in einem Polymer aufgetrennt werden können. Die DNA-Fragmente wandern durch Anlegen einer elektrischen Spannung von der Kathode zur Anode, wobei kleine Fragmente das Polymer schneller durchdringen als große. Der verwendete Forward-Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der durch einen Laser angeregt werden kann und auf diese Weise Licht anderer Wellenlänge emittiert. Diese Informationen werden in elektrische Signale umgewandelt und zur Auswertung graphisch dargestellt. Anschließend erfolgt zur Bestimmung des geeigneten Empfänger-Spenderpaares die Analyse der Fragmentlänge des Amplifikats. Stimmen die jeweiligen Fragmentlängen der beiden Pseudogene zwischen Empfänger und Spender überein, entspricht dies einer MHC-Identität. Zur Durchführung der Kapillarelektrophorese wurden je Ansatz 2 µl Fluoreszenz-markierter DNA-Längenstandard (ILS-600) mit 23 µl Formamid und 1 µl des PCR Produktes in eine 96-Well Platte pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Injektionszeit von 3 s und einer Spannung von 1 kV am Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner) durchgeführt.

3.3 Konditionierung des Empfängers

Zur Konditionierung wurde am Vorabend (< 24 h vor der HSZT) (d-1) der Empfängerhund in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. Guido Hildebrandt) unter einer Vollnarkose (0,01 mg/kg Medetomidin, 0,01 mg/kg Butorphanol, 0,5 - 1 mg/kg Diazepam und 2-3 mg/kg Ketamin) mit einem Multileafkollimator Linearbeschleuniger und einer Dosis von 4,5 Gy (Dosisrate 0,1 Gy/min) Ganzkörper-bestrahlt. Die Applikation des Anästhetikums erfolgte IV.

3.4 Knochenmarkentnahme für die HSZT

Am Tag d0 wurde dem Spenderhund unter Vollnarkose wie in 3.3 beschrieben Knochenmark entnommen. Während der Narkose wurde der Hund entsprechend gelagert und die Atmung, die Herzfrequenz und die Sauerstoffsättigung über ein Pulsoximeter kontrolliert sowie die Schleimhäute und der Lidreflex ständig überwacht. Die für die Transplantation benötigte Knochenmarkmenge wurde nach dem humanen Standardprotokoll auf

10 ml Knochenmark/kg KGW des Empfängers festgelegt. Nachdem alle soeben beschriebenen Parameter erfüllt bzw. ausgeführt wurden, erfolgte vor der Entnahme des Knochenmarks eine Rasur um die geplante Punktionsstelle mit einer Fläche von mindestens 10 x 10 cm. Nun wurde die Punktionsstelle mit Octeniderm® und anschließend mit Betaisodonna Lösung desinfiziert und anschließend das Knochenmark für die Transplantation aus dem proximalen Ende des *Humerus* (Oberarmknochen Vorderlauf), dem *Femur* (Oberschenkelknochen Hinterlauf) und aus der *Crista iliaca* des Beckens entnommen (siehe Abbildung 7). Zur Entnahme des Knochenmarks wurde eine Aspirationsnadel vorsichtig durch die Haut gestochen und unter leicht drehenden Bewegungen in den Knochen eingeführt. Sobald die Markhöhle erreicht war, wurde der Mandrin herausgezogen und eine 20 ml Spritze auf die Nadel gesetzt.



Abbildung 7: Entnahme des Knochenmarks und Überführung in den Transplantationsbeutel

Für die Transplantation wurde unter anderem der *Humerus* (A) und *Femur* (B) punktiert und das Knochenmark durch mehrmaliges Aspirieren gewonnen und anschließend in den mit Antikoagulantien-befüllten Transplantationsbeutel gespritzt (C).

Anschließend wurde das Knochenmark mit ruckartigem Anziehen des Spritzenkolbens aspiriert und in einen mit den Antikoagulantien Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung (CPD) (1,4 ml/kg KGW) und Heparin (1000 IE/kg KGW) befüllten Transfusionsbeutel überführt.

3.5 Transplantataufarbeitung

Die direkte Applikation des Knochenmarks in den *Humerus* und *Femur* erforderte eine Reduktion des Gesamtvolumens des Transplantates. Deshalb erfolgt die Bearbeitung des Transplantates unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank. Das Knochenmark wurde aus dem Transplantationsbeutel über ein 100 µm Zellsieb in 50 ml Falcon-Röhrchen übertragen um Koagel zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation der Zellsuspension (1140 x g bei 8 °C, 16 min ohne Bremse). Hierdurch wurde eine Auftrennung des Knochenmarkblutes in seine Bestandteile anhand ihrer Dichte erreicht (siehe Abbildung 8).

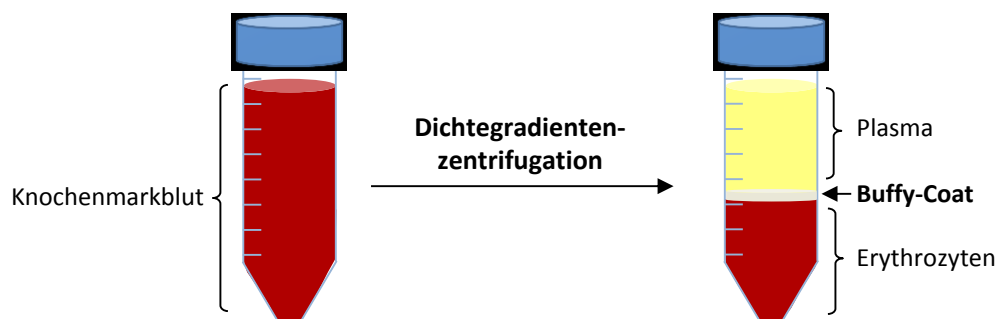


Abbildung 8: Buffy-Coat Präparation aus dem Knochenmarkblut

Nach der Dichtegradientenzentrifugation reichert sich der Buffy-Coat als Interphase zwischen dem Plasma- und den Erythrozyten an. Diese Grenzschrift wird anschließend abpipettiert und für die IBM-HSZT verwendet.

Der auf diese Weise erzeugte Buffy-Coat, eine Grenzschrift zwischen dem Blutplasma und den Erythrozyten, enthält Leukozyten, Thrombozyten und Stammzellen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden vor und nach der Aufbereitung des Knochenmarks jeweils 1,0 ml Knochenmark und Buffy-Coat entnommen. Zur Übertragung in den Knochenmarkraum wurde der Buffy-Coat mit einem Volumen von je 25 ml in zwei 50 ml Spritzen aufgezogen und für die IBM-HSZT verwendet.

3.6 Transplantation der HSZ

3.6.1 Intravenöse Infusion

Den Empfängertieren der Kontrollgruppe wurde das nicht modifizierte Knochenmark anschließend IV über einen Zeitraum von ca. 45 min appliziert (siehe Abbildung 9).

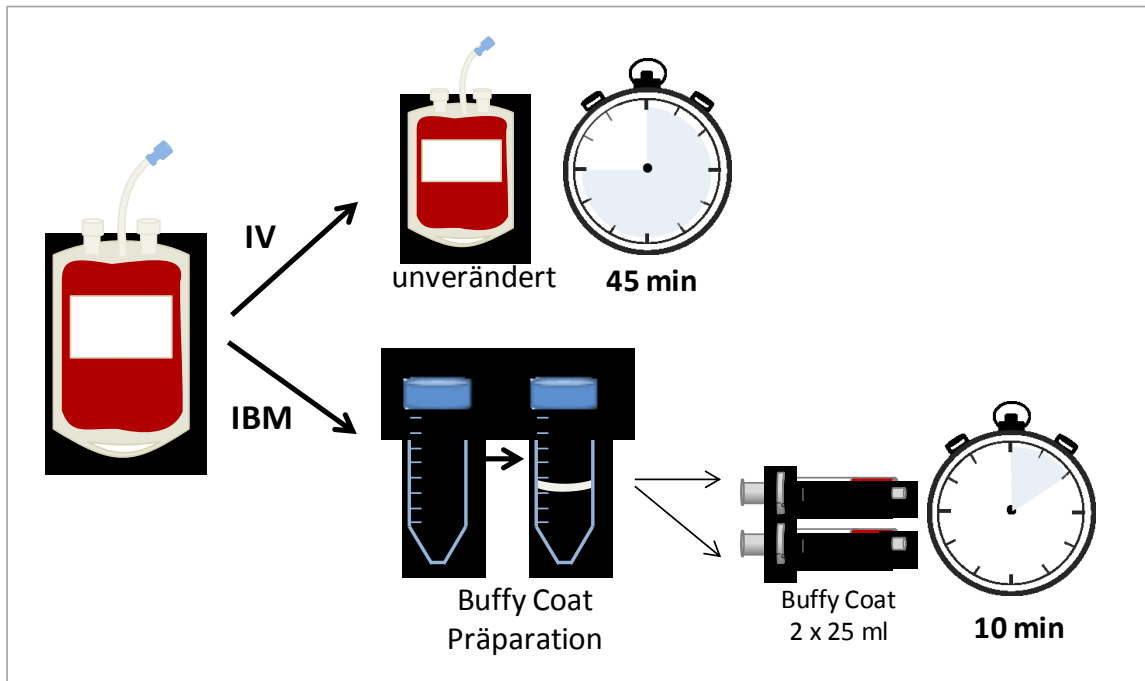


Abbildung 9: Schematische Aufarbeitung des Knochenmarks für die IV- und IBM-HSZT

Die IV-Kohorte bekam das Transplantat unverändert über die *Vena cephalica* über eine Dauer von 45 min verabreicht. Für die IBM-HSZT wurde das Knochenmark zentrifugiert. Der entstandene Buffy-Coat (2 x 25 ml) in Spritzen überführt und dem Hund über einen Zeitraum von 10 min zeitgleich in den *Humerus* und *Femur* appliziert.

3.6.2 Intramedulläre Infusion

Für die IBM-HSZT wurde das Knochenmark wie in 3.4 beschrieben entnommen, aufgearbeitet und in zwei 50 ml Spritzen überführt (siehe Abbildung 9). Zunächst wurden die Spritzen vorbereitet und eine Heidelberger Verlängerung mit je einem Dreiwegehahn mit Schlauch angeschlossen. Anschließend wurde das Empfängertier anästhesiert (siehe 3.3) und jeweils eine Aspirationsnadel unter drehender Bewegung in den *Humerus* und *Femur* eingebracht. Anschließend wurde der Mandrin entfernt und der korrekte Sitz der Nadel durch kurzes Aspirieren von Knochenmark überprüft.

Der Dreiwegehahn mit Schlauch wurde an der Aspirationsnadel befestigt und das aufgearbeitete Knochenmark wurde über einen Infusionszeitraum von 10 min mittels Perfusoren zeitgleich in den *Humerus* und *Femur* appliziert (siehe Abbildung 10).

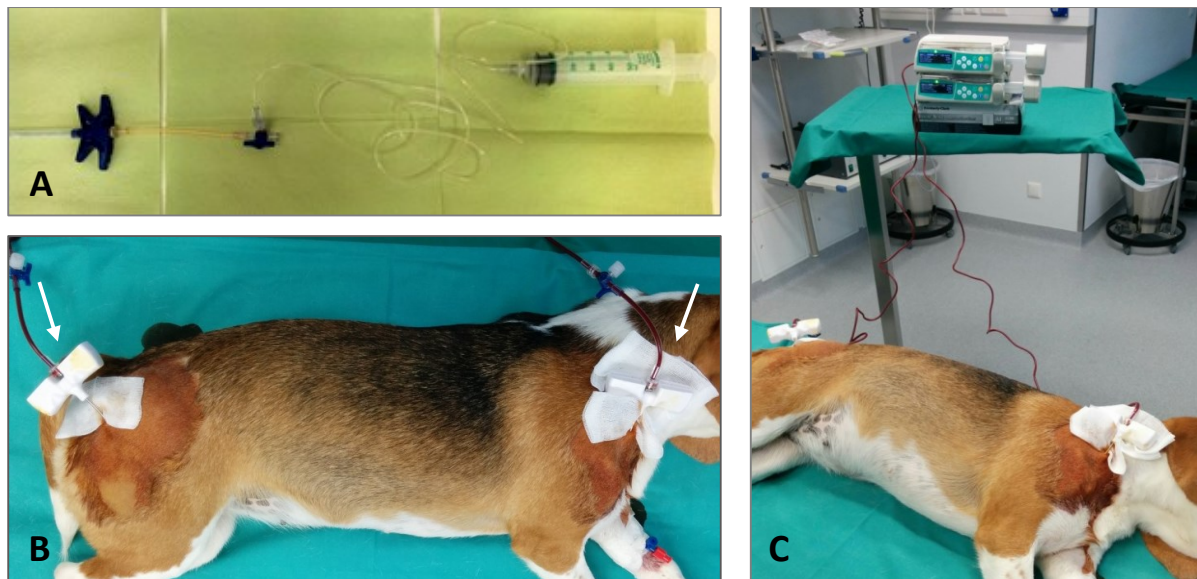


Abbildung 10: IBM-HSZT mittels Perfusoren in den *Humerus* und *Femur*

Die Übertragung des HSZ aus der Spritze wurde über ein System aus Heidelberger Verlängerung und Dreiwegehahn mit Schlauch, welcher an die Aspirationsnadel befestigt war, durchgeführt (A). Die HSZ wurden unter gleichbleibenden Druck in 10 min mithilfe der Perfusoren in den *Humerus* (Pfeil rechts) und *Femur* (Pfeil links) des Hundes infundiert (B), (C).

3.7 Chimärismusanalyse: Nachweis des Transplantatanwachsens nach allogener HSZT

3.7.1 Isolierung der PBMC und Granulozyten aus dem peripheren Blut

Die Isolierung der PBMC und der Granulozyten erfolgte ebenfalls mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Erythrozyten und Granulozyten setzen sich hierbei am Boden ab. Die mononukleären Zellen weisen eine geringere spezifische Dichte als die Separationslösung auf und sammeln sich deshalb als Interphaseschicht zwischen Biocoll und plasmahaltigem Überstand an.

Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit 6 °C kaltem PBS vermischt und vorsichtig mit einer serologischen Pipette auf die Separationslösung mit einer Dichte von $\rho = 1.074 \text{ g/ml}$ überschichtet. Anschließend wurde für 15 min mit $1040 \times g$ bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene PBMC-Ring wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 45 ml PBS für 8 min bei $200 \times g$, 4 °C und Bremse 6 zweimal gewaschen. Das Zellsediment, bestehend aus Granulozyten und Erythrozyten, wurde ebenfalls mit einer Pasteurpipette geerntet und in ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Für die Erythrozytenlyse wurden 45 ml

Ammoniumchlorid zur Probe gegeben und in einem Wasserbad bei 40 °C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte durch Abzentrifugieren und zweimaligem Waschen mit PBS für 8 min mit 200 x g bei 4 °C und Bremse 6 das Reinigen der Granulozyten.

3.7.2 Isolierung des Knochenmarks

Zur Isolierung der Knochenmarkzellen wurde das entnommene Knochenmarkblut über ein 100 µm Zellsieb gefiltert, um Koagel zu entfernen. Anschließend wurde zu der Probe NH₄CL gegeben und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur die Erythrozyten lysiert. Danach wurde die Erythrozytenlyse für 8 min bei 200 x g, 4 °C herunterzentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS bei gleicher Zentrifugationseinstellung gewaschen.

3.7.3 DNA-Extraktion

Die Isolierung der DNA aus den PBMC, den Granulozyten, dem Knochenmark und dem Vollblut erfolgte mithilfe des NucleoBond® CB 100 Aufreinigungs-Kits nach Anleitung des Herstellers. Der Zellaufschluss wurde durch die Zugabe von 5 ml Lysepuffer (G2) und vortexen der Probe erreicht. Danach wurden 100 µl Proteinase K zum Zelllysate gegeben und für 60 min bei 50 °C inkubiert. Dieser Schritt bewirkte den Abbau der Proteine und somit die Freisetzung der DNA. Anschließend wurden zur Probe 5 ml Äquilibrierungspuffer (N2) pipettiert. Dieses Gemisch wurde nun über eine äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben, welche sich auf einem 50 ml Falcon-Röhrchen befand. Auf diese Weise wurde die negativ geladene DNA in der Säule gebunden. Im Anschluss wurde die in der Säule gebundene DNA mit 12 ml Waschpuffer von degradierter RNA, Proteinen und Puffersubstanzen gereinigt. Die DNA wurde im Folgenden durch 5 ml Elutionspuffer (N5) aus der Säule eluiert. Die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und das anschließende Schwenken der Probe führten zu einem sichtbaren DNA-Präzipitat. Die ausgefallene DNA wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei 1140 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und damit gereinigt. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Pelletgröße wurden anschließend 50-200 µl Aqua dest. dazugegeben und das Pellet resuspendiert. Die Konzentrationsmessung der DNA am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgte am darauffolgenden Tag. Die Reinheit der DNA wurde über den Quotienten von A₂₆₀/A₂₈₀ kontrolliert, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

Anschließend wurde die extrahierte DNA für die Typisierung und die Chimärismusanalyse verwendet.

3.7.4 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, DNA anhand ihrer Größe in einem Gel im elektrischen Feld aufzutrennen. Aufgrund ihrer negativen Ladung migriert die DNA stets vom negativen Pol (Kathode) in Richtung des positiven Pols (Anode). Kleine DNA-Fragmente wandern schneller durch das Agarosegel als große.

Zur Trennung und Überprüfung der für die Typisierung und Chimärismusanalyse genutzten Amplifikate wurden 2,5 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 6,25 g Agarose in 250 ml TBE-Puffer aufgekocht und gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10,6 µl Ethidiumbromid (0,2 µg/ml). Nach Polymerisation des Agarosegels wurde es in die Gelelektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer vollständig bedeckt. Die Beladung der Geltaschen erfolgte mit je 4 µl 6x DNA-Ladepuffer und 8 µl PCR-Produkt. Als Referenz wurde ebenfalls ein DNA-Größenstandard aufgetragen, um die Fragmentgrößen der PCR-Produkte später bestimmen zu können. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 160 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Die Detektion der einzelnen Banden erfolgte unter UV-Licht in der Geldokumentationskammer.

3.7.5 VNTR-Analyse: PCR-Untersuchung spezifischer Minisatelliten

Voraussetzung für die Quantifizierung der Spenderhämatopoese im Empfänger ist eine eindeutige Unterscheidung der beiden Individuen voneinander. In DLA-identischen Geschwistertieren ist dies anhand von Unterschieden in polymorphen VNTR- (variable number of tandem repeats) Regionen möglich [86]. Im Vorfeld der HSZT wurde daher mittels PCR und Kapillarelektrophorese für jedes einzelne Spender/Empfänger-Paar die VNTR-Region ermittelt, welche eine eindeutige Unterscheidung und Quantifizierung erlaubte. Die zur Verfügung stehenden Primerpaare zur Amplifizierung spezifischer VNTR-Regionen sind im Anhang in Tabelle 18 aufgeführt. Die Chimärismusbestimmung wurde mit DNA aus den PBMC, den Granulozyten und dem Knochenmark durchgeführt (siehe 3.7.3). Ein Anwachsen des Transplantates ist per Definition dann gegeben, wenn eine Spenderhämatopoese von $\geq 5\%$ im Empfänger nachgewiesen werden kann. Ein Abstoßen hingegen liegt vor, wenn jeweils

zweimal in den Granulozyten und PBMC und einmal im Knochenmark ein Spenderanteil von 0 % nachgewiesen wird.

Die PCR zur VNTR-Analyse wurde nach folgendem Schema pipettiert (siehe Tabelle 4) und mit dem entsprechenden Cyclerprogramm durchgeführt (siehe Tabelle 5). Parallel zu jeder PCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die neben den Komponenten für die PCR Aqua dest. statt der DNA-Probe enthielt.

Tabelle 4: Pipettierschema für den 25 µl PCR-Ansatz der VNTR-Regionen

Agens	Volumen
10 x PCR Puffer	2,5 µl
100 mM dNTPs	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,0 µl
50 pM Forward Primer	0,5 µl
50 pM Reverse Primer	0,5 µl
2,5 Unit Taq-Polymerase	0,1 µl
50 ng/µl DNA	1,0 µl
Aqua dest.	ad. 25 µl

Tabelle 5: Cycler Programm für die PCR der VNTR-Regionen

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	1
94 °C	40 s	34
54-65 °C	40 s	
72 °C	40 s	
72 °C	5 min	1
4 °C		∞

Die anschließende Kapillarelektrophorese wurde, wie in 3.2 erläutert, durchgeführt. Die graphische Darstellung und Auswertung der Fragmentlängen der VNTR-Regionen erfolgte durch die Peak Scanner™ Software und ist exemplarisch für Primer 2001 in der Abbildung 11 gezeigt. Zur Bestimmung der Größe der Mikrosatelliten diente der mit den Proben mitgeführte Längenstandard. Der Spenderchimärismus wurde anhand der Bereiche unter dem Spender- bzw. Empfängerpeak quantifiziert.

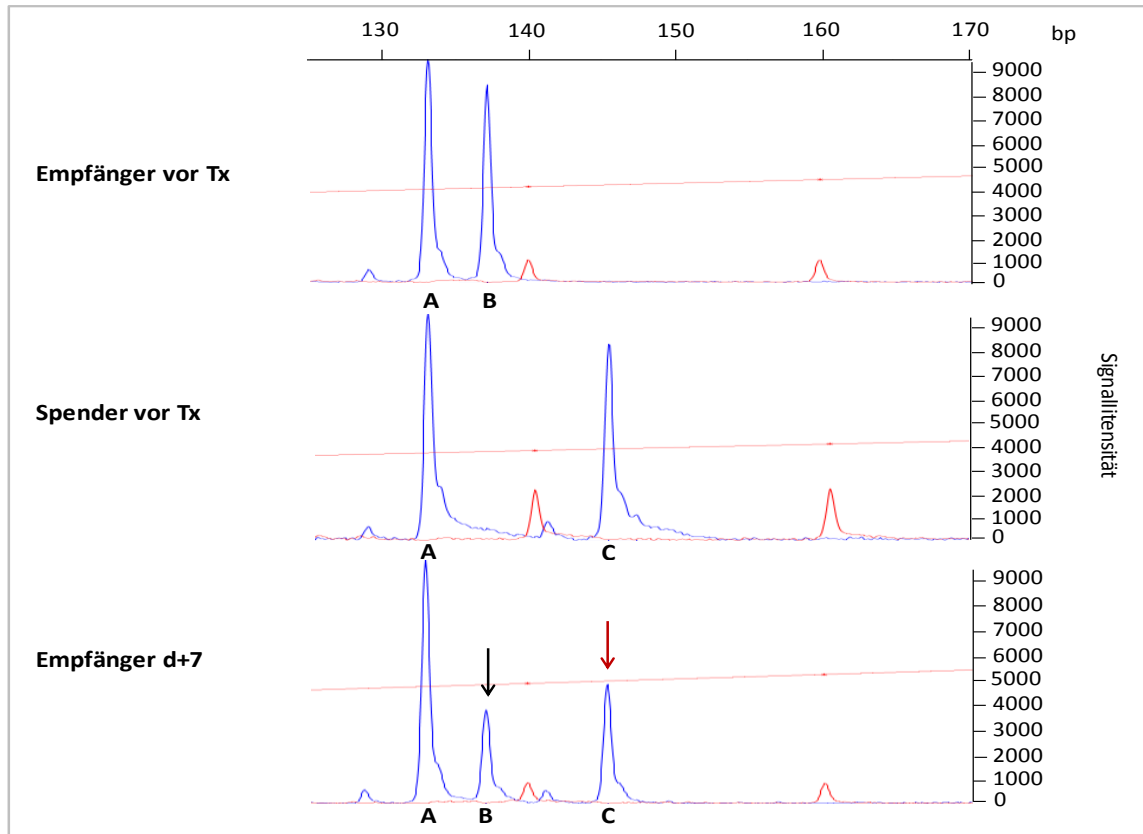


Abbildung 11: Kapillarelektrophoretische Analyse zur Chimärismusbestimmung

Exemplarische Darstellung der Fragmentlängen (in Basenpaaren, bp) der VNTR-Regionen vom Spender und Empfänger (blau) und des Längensstandards (rot). Die Abbildung zeigt die spezifischen Peaks des Hundes 5 (IV-Gruppe) und seines Spenders unter Verwendung des Primers 2001. Spender und Empfänger weisen eine gemeinsame VNTR-Region mit einer Fragmentlänge von 133 bp auf (A) und je eine für das jeweilige Individuum spezifische VNTR-Region mit einer Länge von 137 bp für den Empfänger (B) und 145 bp für den Spender (C). An Tag d+7 nach der HSZT ist der Spenderpeak im peripheren Blut des Empfängers nachweisbar (schwarzer Pfeil). Mithilfe der Flächen unter den Kurven der spezifischen Peaks B und C kann der Spenderchimärismus quantifiziert werden.

3.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Oberflächenantigenen und intrazellulären Molekülen. Einzelzellen können in einer Suspension charakterisiert werden. Hierfür werden die Zellen durch einen Laserstrahl geführt, wobei unterschiedliche Lichtsignale erzeugt werden. So geben zum einen Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) die relative Größe und das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) die relative Granularität der Zellen an. Zum anderen beruht das Prinzip auf der Antigen-Antikörper Bindung mit fluoreszierenden Antikörpern (engl. fluorescence activated cell sorting; FACS). Beim Abfallen auf das Ursprungsniveau wird

Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge emittiert, die dann durch einen Detektor als quantitative Information ausgewertet wird.

Die Messungen erfolgten mit 50 000 Ereignissen je Probe und wurden für die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Transplantate und zur Bestimmung des leukozytären Subpopulation angewendet. Die Auswertung wurde mit dem Analyseprogramm Cell Quest Pro durchgeführt.

3.8.1 Analyse der zellulären Transplantatzusammensetzung

Das Transplantat wurde im unmodifizierten Zustand bzw. für die IBM-Gruppe zusätzlich nach Aufarbeitung auf seine zellulären Bestandteile untersucht. Von besonderer Bedeutung ist vor allem der Anteil an der Gesamtzahl nukleärer Zellen (engl. total nucleated cells, TNC), HSZ (CD34⁺), Monozyten (CD14⁺), T-Zellen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), B-Zellen (CD21⁺) und Leukozyten (CD45⁺). Für die Analyse wurde 1 ml Knochenmark bzw. Buffy-Coat 1:4 mit PBS verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 2,7 ml in eine EDTA-Monovette überführt und ein Blutbild im Zentrallabor erstellt. Der überschüssige Anteil der Probe wurde für die FACS Analyse verwendet. Hierfür wurden 100 µl Zellsuspension in je ein FACS-Röhrchen überführt und die Antikörper in der entsprechenden Menge dazu pipettiert (siehe Tabelle 6)

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper zur Transplantatanalyse

Antikörper	Volumina [µl]
Isotypenkontrolle zu CD21	10,0
Isotypenkontrolle zu CD45	1,8
Isotypenkontrolle zu CD34	10,0
CD3 FITC	5,0
CD45 FITC	1,8
CD 4 PE	1,8
CD8 PE	10,0
CD14 PE	10,0
CD21 PE	10,0
CD34 PE	10,0

Die Zellen inkubierten mit den Antikörpern 25 min im Dunkeln bei 4-6 °C. Die nachfolgende Erythrozytenlyse erfolgte für 25 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal für 8 min mit 180 x g und bei 8-10 °C mit Bremse 7 gewaschen.

Das Zellpellet wurde nach dem Waschen zur Messung in 400 µl PBS aufgenommen und noch am gleichen Tag analysiert.

3.8.2 Analyse der leukozytären Subpopulationen

Damit Störungen des Immunsystems erkannt werden können, werden durch die Differenzierung der Leukozyten des peripheren Blutes diagnostische und therapierelevante Informationen für Patienten ermittelt. Da die HSZT mit einer transienten Immundefizienz einhergeht, wurde die leukozytären Subpopulationen vor und nach Transplantation bestimmt. Anhand der Verteilung der T-Helferzellen (CD4⁺) und den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) im Blut wurde das Verhältnis dieser Lymphozytensubgruppen zueinander berechnet. Der Normalwert der CD4⁺/CD8⁺-Ratio ist für Hunde zwischen 1,13 und 2,31 definiert, für den Menschen liegt er bei 2,0. Zur Bestimmung wurden wöchentlich bis d+35 und danach an d+56, d+84 und d+112 2,7 ml EDTA-Blut entnommen. Dazu wurden im Zeitraum der Leuko- und Thrombozytopenie 150-180 µl Blut benötigt und nach Erholung der Hämatopoese 100-120 µl Blut in je ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die Volumina der verwendeten Antikörperlösungen zur Analyse der Oberflächenantigene sind in der Tabelle 7 dargestellt. Die Durchführung der Antikörperfärbung erfolgte wie in 3.8.1 beschrieben.

Tabelle 7: Übersicht der Antikörper zur CD4/CD8 Ratio Bestimmung

Antikörper	Volumina [µl]
Isotypenkontrolle zu CD3	5,0
Isotypenkontrolle zu CD14	10,0
Isotypenkontrolle zu CD4	1,5
CD3 FITC	5,0
CD25 FITC	10,0
CD4 PE	1,5
CD14 PE	10,0
CD8 PE	10,0
CD21 PE	10,0

3.9 Verlaufsuntersuchungen

3.9.1 Klinischer Status des Hundes in der Posttransplantationsphase

Der Beobachtungszeitraum des Empfängertieres betrug 16 Wochen. An d-1 wurde mit der Immunsuppression begonnen (CsA, 15 mg/kg KGW, 2 x täglich), die bis d+35 nach HSZT zweimal täglich oral verabreicht wurde. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite des CsA wurde für den Zeitraum der Applikation eine Talspiegelkontrolle aus 2,7 ml EDTA-Blut im Zentrallabor des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt. Die Blutentnahme zur Talspiegelmessung erfolgte am Morgen unmittelbar vor der nächsten Gabe des Medikaments und mindestens 12 h nach der letzten Applikation.

Darüber hinaus wurde an den Tagen d-1 bis d+35 (Zeit der Immunsuppression), zweimal täglich eine Visite des Empfängers zur Einschätzung des Allgemeinbefindens durchgeführt. Neben der täglichen Kontrolle von Vitalwerten wie Herz- und Atemfrequenz wurden zusätzlich weitere physiologische Parameter wie Körpertemperatur, Gewicht, Nahrungsaufnahme, Stuhlgang und Aktivität dokumentiert (siehe Tabelle 8).

Jede Behandlung am Hund, wie z. B. Blutentnahme oder Medikamentengabe, wurde für jedes Tier in einer Verlaufsdocumentation protokolliert. Als Prophylaxe vor Infektionen bei einer auftretenden Leukozytopenie (Abfall der Leukozytenwerte auf $< 1,0 \times 10^9/l$) erhielten die Hunde während der immunsuppressiven Behandlung das Antibiotikum Enrofloxacin in oraler Form. Sobald trotz antibiotischer Therapie Fieber ($> 39,3^\circ\text{C}$ Körpertemperatur) auftrat, wurden zudem fiebersenkende Medikamente appliziert und die Antibiose um Amoxicillin mit Clavulansäure erweitert, um das Risiko einer möglichen Infektion zu minimieren.

Tabelle 8: Übersicht der erhobenen Parameter und deren Graduierung zur Bewertung des klinischen Status

Parameter	Grad der Toxizität			
	0	1	2	3
Stuhlgang	fest	breiig	Diarrhö	blutig
Gewichtsverlust*	< 500 g	> 500 g	> 1000 g	
Nahrungsaufnahme	normal	reduziert	keine	
Temperatur	37,5-38,9 °C	39,0-39,9 °C	> 40 °C	
Aktivität	lebhaft	ruhig	reduziert	keine

*in Bezug auf das Ausgangsgewicht an d-1

3.9.1.1 Physiologische Parameter

Zur Bewertung des allgemeinen klinischen Status nach IV- und IBM-HSZT wurden die Parameter Körpertemperatur, Gewicht, Nahrungsaufnahme, Stuhlgang und Aktivität während der ersten fünf Wochen nach HSZT täglich, anschließend in wöchentlichen Intervallen dokumentiert. Darüber hinaus wurden die Epidermis, die Mundschleimhaut sowie die Rötung der Augen beobachtet, um mögliche Anzeichen einer GvHD frühzeitig zu erkennen. Die Graduierung der Toxizität ist in der Tabelle 8 aufgelistet.

3.9.1.2 Überprüfung der Laborparameter

Die hämatologische Toxizität wurde anhand der Leukozyten- und Thrombozytenwerte bestimmt. Die Thrombozytopenie war definiert als absolute Verringerung der Thrombozytenanzahl im peripheren Blut auf $< 20 \times 10^9/l$. Der Grenzwert der Leukozytopenie war bei $< 1,0 \times 10^9/l$ festgelegt. Darüber hinaus wurden weitere Laborparameter während des Gesamttransplantationsverlaufs erhoben (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der gemessenen Laborparameter für die gesamte Posttransplantationsphase

Hämatologie	Leberwerte	Nierenwerte	Lipide	Elektrolyte
Leukozyten	ALAT	Creatinin	Cholesterol	Natrium
Thrombozyten	ASAT	Harnstoff	Triglycerin	Kalium
Hämoglobin	γ GT			Calcium
Hämatokrit	AP			Phosphat
Erythrozyten				
MCV				
MCH				
MCHC				
Bilirubin				

Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alkalische Phosphatase (AP), Gamma Glutamyltransferase (γ GT)

3.9.2 Probenentnahme für die Diagnostik

3.9.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vorderbeinvene (*Vena cephalica*) oder der Hinterbeinvene (*Vena saphena lateralis*). Der entsprechende Bereich wurde vor der Blutentnahme rasiert und

mit Octeniderm® desinfiziert. Zum Punktieren der Vene wurde ein Stauschlauch angelegt und mit einer Flügelkanüle das Blut in S-Monovetten abgenommen. Das Blut zur Kontrolle des Blutbildes und des Chimärismus wurde in EDTA-Monovetten gesammelt. Die Leber- sowie Nierenparameter wurden in Li-Heparin-Blut untersucht.

3.9.2.2 Knochenmarkentnahme

Zusätzlich zur Bestimmung des Spenderchimärismus aus dem peripheren Blut wurden an den Tagen d+14, d+28, d+56, d+84 und d+112 nach HSZT ebenso Proben aus dem Knochenmark gewonnen. Für die Analyse wurden ca. 5 ml Knochenmark aus dem *Humerus* nach dem gleichen Verfahren wie in 3.4 beschrieben entnommen. Hierfür wurde als Antikoagulans 0,5 ml Natrium-EDTA zur Knochenmarkaspiration in eine 20 ml Spritze vorgelegt.

3.9.3 Bluttransfusion

Nach der HSZT kam es hauptsächlich aufgrund der Konditionierung zu einem Abfall der Leukozytenzahlen, aber auch der Thrombozytenwerte. In der Phase der Thrombozytopenie ($< 20 \times 10^9/l$) musste mit einer erhöhten Blutungsneigung gerechnet werden. Die Hunde wurden in dieser Zeit vermehrt auf Blutungszeichen in Form von Petechien in den Ohren, der Mundschleimhaut und der Haut hin untersucht. Der Bedarf einer Bluttransfusion war gegeben, wenn über 72 h unverändert entweder die Thrombozytenwerte auf $\leq 5 \times 10^9/l$ abfielen oder der Hämatokrit weniger als 25 % betrug bzw. Blutungszeichen auftraten. Kamen Unwohlsein des Tieres oder Fieber hinzu, wurde bereits bei Werten $\leq 10 \times 10^9/l$ substituiert. Für eine Bluttransfusion wurden 150 ml Vollblut von dem Spenderhund entnommen. Dazu wurden drei 50 ml Spritzen mit jeweils 500 I.E. Heparin-Natrium 25.000 vorbereitet. Die Entnahme erfolgte aus der Halsvene (*Vena jugularis*). Das Blut wurde anschließend aus den Spritzen in einen Transferbeutel überführt und in einer Gammabestrahlungsanlage mit einer Dosis von 25 Gy bestrahlt. Die Transfusion des Blutes erfolgte IV über die *Vena cephalica* über einen Zeitraum von 45 min.

3.10 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Hunde der Rasse Beagle verwendet, die von einem lizenzierten Unternehmen stammten, welches über eine Genehmigung zur Zucht und Haltung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken verfügt. Alle Hunde wurden routinemäßig entwurmt und

erhielten regelmäßige Schutzimpfungen gegen Tollwut, Staupe, Parvovirose, Leptospirose, Hepatitis contagiosa canis und Parainfluenza canis. Das Versuchsvorhaben wurde durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen: 7221.3-1.1-028/13).

3.11 Statistik

Es erfolgte eine Auswertung des Spenderchimärismus, der Regeneration der Hämatopoese, der Transplantatzusammensetzung, der leukozytären Subpopulationen und der Toxizität mit Microsoft Office Excel 2007. Die Ergebnisse sind als Median mit entsprechender Angabe des Minimum (Min) und Maximum (Max) berechnet und im Ergebnisteil dargestellt. Die statistische Analyse zur Berechnung der Signifikanzen zwischen der IV- und IBM-Gruppe wurde bezüglich der Charakteristika der Empfänger, der Transplantatzusammensetzung, des Spenderchimärismus, der leukozytären Subpopulationen sowie der Toxizität mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt (IBM SPSS Statistics Version 22.0).

Die Fallzahlberechnung erfolgte durch eine Power-Analyse mit dem statistischen Programm R (Version 2.15.1). Um eine 80 %ige Wahrscheinlichkeit bei einer Differenz von $0,5 \times 10^9/\text{l}$ in den Mittelwerten der Leukozyten von Tag 21 und 28 bei einer Standardabweichung von $1 \times 10^9/\text{l}$ mit dem Signifikanzlevel von $< 0,05$ zu erhalten.

4 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zur IV- und IBM-HSZT nach intensitätsreduzierter Konditionierung an Hunden der Rasse Beagle durchgeführt. Die IV-Kohorte umfasste sieben Tiere. In der IBM-Gruppe konnten aufgrund eines frühen Todes an d+15 nach HSZT für einen Hund (H7) keine hinreichenden Daten bezüglich der Entwicklung des Spenderchimärismus und der hämatologischen Regeneration ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde die IBM Gruppe um einen zusätzlichen Hund erweitert und umfasste somit acht Tiere.

4.1 Charakteristika der Empfänger und Spender

In der Tabelle 10 sind die Charakteristika Alter, Geschlecht und Ausgangsgewicht der Tiere zum Zeitpunkt der HSZT zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 10: Charakteristika der transplantierten Hunde

Gruppe	Hund	Geschlecht Spender	Geschlecht Empfänger	Alter [Monate]	Gewicht [kg]
IV	1	m	w	20,4	14,4
	2	w	w	20,6	14,6
	3	m	m	25,4	13,8
	4	m	m	25,2	12,0
	5 ^a	m	w	19,9	14,5
	6 ^b	w	m	21,7	17,4
	7	w	w	21,9	14,8
	Median			21,7	14,5
IBM	1	m	w	22,2	12,2
	2	m	w	22,4	18,4
	3	m	w	27,0	13,8
	4	m	m	28,2	18,6
	5	m	w	17,1	13,0
	6	w	m	20,1	15,0
	7 ^c	w	m	20,5	18,0
	8	w	w	10,1	13,4
	Median			21,4	14,4
p-Werte (IV vs. IBM)				ns	ns

w = weiblich, m = männlich;

verstorbene Hunde (Todesursache): ^a) d+168 (GVHD), ^b) d+79 (Hämolyse), ^c) d+15 (bakterielle Infektion)

Die Tiere der IV-Gruppe wiesen zum Zeitpunkt der HSZT ein medianes Alter von 21,7 Monaten und ein medianes Gewicht von 14,5 kg auf. In der IBM-Gruppe wiesen die Tiere ein vergleichbares medianes Alter von 21,4 Monaten und ein ebenso vergleichbares medianes Gewicht von 14,4 kg auf ($p = ns$ für Alter und Gewicht)

4.2 Charakterisierung der Stammzelltransplantate

Für die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der Transplantate wurde die Gesamtanzahl der TNC, der HSZ ($CD34^+$), der Monozyten ($CD14^+$) und der Anteil an T-Zellen ($CD3^+$) bestimmt. Die in der Tabelle 11 aufgezeigten Zellzahlen der einzelnen Subpopulationen des Transplantates wurden in der IV-Gruppe aus dem nicht modifizierten Knochenmark berechnet. Für die IBM-Gruppe hingegen wurden die Werte aus dem transplantierten Buffy-Coat nach der Transplantataufarbeitung angegeben (siehe Tabelle 11).

Die TNC betrug im Median in der IV-Gruppe $3,5 \times 10^8$ Zellen/kg KGW und in der IBM-Gruppe $4,1 \times 10^8$ Zellen/kg KGW. Der Anteil an $CD34^+$ Zellen in den Transplantaten lag median in der IV-Gruppe bei $2,3 \times 10^6$ Zellen/kg und in der IBM-Kohorte bei $3,2 \times 10^6$ Zellen/kg KGW. Des Weiteren enthielt das Transplantat Monozyten im Median $2,1 \times 10^7$ Zellen/kg KGW (IV) und $2,7 \times 10^7$ Zellen/kg KGW (IBM). Die Analyse der $CD3^+$ Zellen ergab in der IV-Kohorte median $1,6 \times 10^7$ Zellen/kg KGW und in der IBM-Gruppe median $2,9 \times 10^7$ Zellen/kg KGW. Im Vergleich beider Transplantationsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kernhaltigen zellulären Zusammensetzung der applizierten Transplantate festgestellt werden. Das aktuell geltende Tierschutzgesetz hatte für dieses Versuchsvorhaben eine intentionelle Transplantation von „schwachen Transplantaten“ nicht zugelassen, klinisch bedingte zufällig „schwache“ Transplantate waren erlaubt. In jeder Transplantationsgruppe wurden jeweils zwei Transplantate verwendet, die eine geringe $CD34^+$ -Zellzahl ($\leq 2 \times 10^6$ /kg) aufwiesen. In der IV-Kohorte erhielten die Hunde 3 und 4 solch ein Transplantat, wobei dieses $1,0 \times 10^6$ /kg bzw. $2,0 \times 10^6$ /kg $CD34^+$ -Zellen beinhaltete. In der IBM-Gruppe waren es die Hunde 1 und 2, deren Transplantate einen Gehalt an $CD34^+$ -Zellen von $1,3 \times 10^6$ /kg und $1,2 \times 10^6$ /kg aufwiesen.

Tabelle 11: Auflistung der zellulären Zusammensetzung der verwendeten Transplantate

Gruppe	Hund	TNC		CD34 ⁺		CD14 ⁺		CD3 ⁺	
		[x 10 ⁸ /kg KGW]	[abs. x 10 ⁸]	[x 10 ⁶ /kg KGW]	[abs. x 10 ⁷]	[x 10 ⁷ /kg KGW]	[abs. x 10 ⁷]	[x 10 ⁷ /kg KGW]	[abs. x 10 ⁷]
IV	1	3,9	57,4	3,9	5,8	1,7	25,1	1,4	20,1
	2	2,8	41,2	4,2	6,1	0,9	13,4	0,9	12,5
	3	1,9	26,3	1,0	1,3	1,2	16,1	1,2	16,2
	4	3,3	40,8	2,0	2,4	2,1	25,9	2,4	29,9
	5	5,0	73,0	7,2	10,4	3,6	52,8	2,8	40,3
	6	3,5	62,7	2,3	4,1	2,4	43,3	1,6	28,4
	7	3,9	53,2	2,3	3,2	2,9	39,0	1,9	26,0
	Median	3,5	53,2	2,3	4,1	2,1	25,9	1,6	26,0
IBM	1	5,4	63,2	1,3	1,5	3,4	39,8	3,3	38,6
	2	2,8	50,8	1,2	2,1	1,6	29,0	1,3	24,0
	3	2,3	31,7	2,5	3,4	1,7	23,2	1,5	21,1
	4	3,3	60,5	3,8	7,0	2,5	45,6	2,9	54,3
	5	4,8	61,8	10,0	13,0	3,3	42,7	2,9	37,7
	6	6,0	85,7	6,6	9,4	3,0	42,4	3,8	54,4
	7	2,4	43,0	2,4	4,3	1,6	29,5	1,8	31,9)
	8	5,6	70,7	7,0	8,8	4,2	52,4	4,4	55,7
	Median	4,1	61,1	3,2	5,7	2,7	41,1	2,9	38,2
p-Werte (IV vs. IBM)		ns		ns		ns		n.s	

TNC: total nucleated cells, CD34⁺: HSZ, CD14⁺: Monozyten, CD3⁺: T-Zellen

4.3 Allgemeines Überleben nach allogener HSZT: IV versus IBM

Die vergleichenden Untersuchungen zur IV- und IBM-HSZT wurden insgesamt an 15 Beagle Hunden durchgeführt. Insgesamt traten drei Todesfälle im Verlauf der HSZT auf. Die Tiere verstarben aufgrund klassischer, sehr häufig auftretender Komplikationen der HSZT.

Das Gesamtüberleben für den Posttransplantationsverlauf lag bei der IV-Gruppe bei 5/7 (71 %) Tieren. In der IV-Gruppe entwickelte Hund 5 an d+52 eine GvHD und wurde nach intensiver Therapie (siehe 4.7.2 Einzelfallbetrachtung) an d+168 euthanasiert. Des Weiteren trat bei Hund 6 an d+69 eine nicht kontrollierbare transplantationsassoziierte Immunhämolyse auf, worauf das Tier an d+79 euthanasiert wurde.

Die IBM-Übertragung der HSZ direkt ins Knochenmark wurde von allen Hunden der IBM-Gruppe sehr gut vertragen und die Applikation des Gesamtvolumens von 2 x 25 ml Buffy-Coat erfolgte problemlos in den *Humerus* und *Femur*.

In Gegensatz zur IV-Gruppe überlebten in der IBM-Kohorte 7/8 (88 %) Tiere. Der Hund 7 verstarb frühzeitig an d+15 durch eine bakterielle Infektion.

4.4 Kinetik der hämatopoetischen Regeneration

Durch die Konditionierung und Immunsuppression kommt es im Verlauf zu einer Aplasie-Phase, in der es vor allem an Leukozyten und Thrombozyten mangelt. Dieser Zustand wird generell mit einer Verzögerung von etwa 10-14 Tagen durch die transplantierten Spender-HSZ im Rahmen der beginnenden Regeneration der Hämatopoese wieder ausgeglichen.

In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der Regeneration der Hämatopoese als der erste von drei aufeinanderfolgenden Tagen definiert, an denen die Leukozytenwerte $\geq 1,0 \times 10^9/l$ und die Thrombozytenwerte $\geq 20 \times 10^9/l$ gemessen wurden.

Die Abbildung 12 stellt den Gesamtverlauf der Hämatopoese bis zum Zeitpunkt d+56 nach IV- und IBM-HSZT dar. Es wird deutlich, dass bei beiden Applikationsmethoden in allen Tieren die Leukozytenwerte in den ersten sieben Tagen der Posttransplantationsphase auf unter $1,0 \times 10^9/l$ fielen.

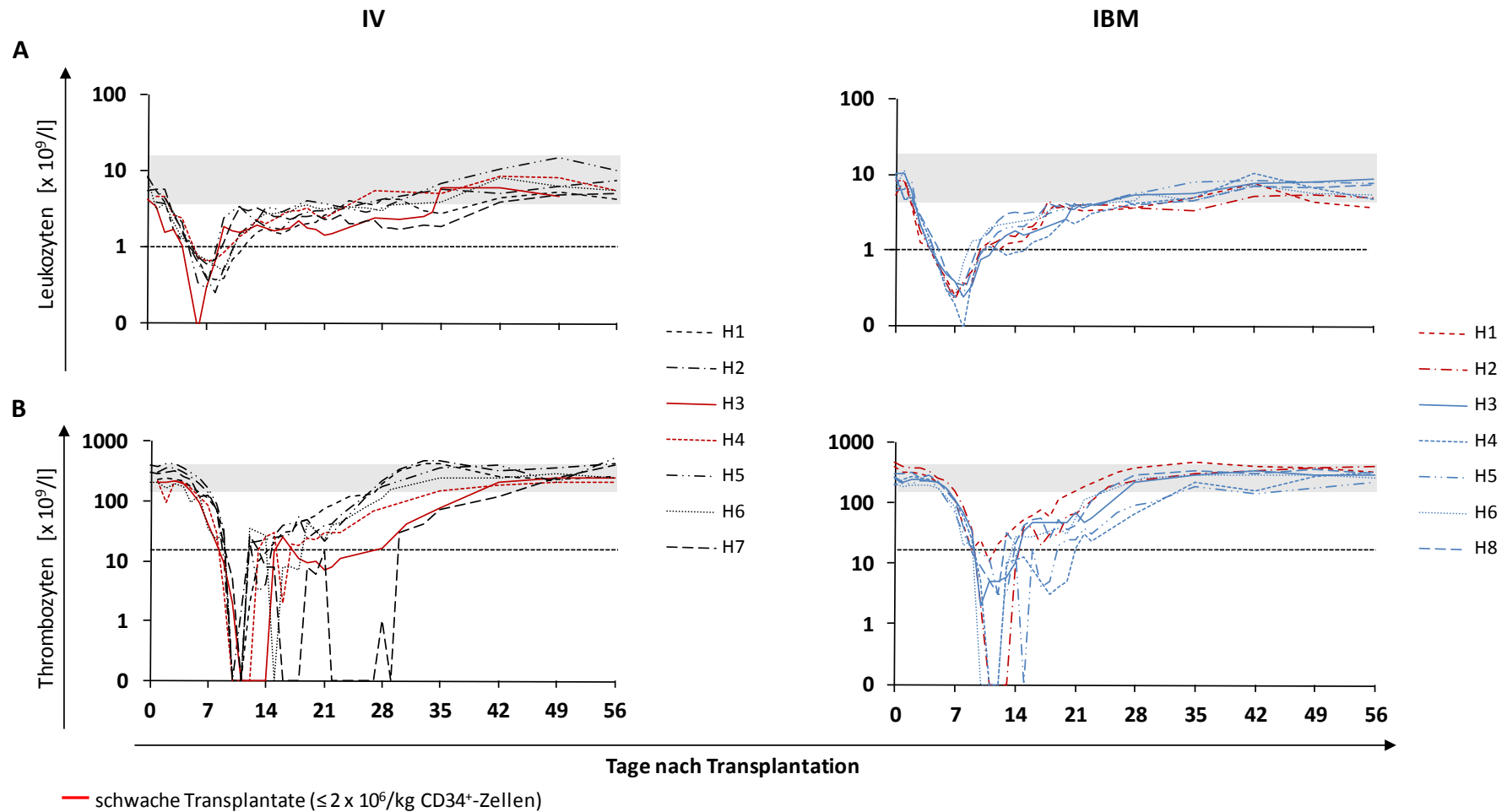


Abbildung 12: Regeneration der Hämatopoese nach der IV- und IBM-HSZT

Verlauf der Leukozyten- (A) und Thrombozyten- (B) Regeneration über einen Zeitraum von 56 Tagen nach IV- und IBM-HSZT. Die grau markierte Fläche stellt den Referenzbereich der Leuko- bzw. Thrombozytenzahlen für Hunde dar. Rot gekennzeichnete Linien zeigen den Verlauf nach HSZT von Transplantaten mit geringer CD34⁺-Zellzahl. Die gestrichelte Linie gibt den Grenzwert für die Regeneration beider Zellpopulationen an (Leukozyten = $1,0 \times 10^9/l$; Thrombozyten = $20 \times 10^9/l$). Die einzelnen Linien stehen für je einen Hund (H1-H8).

4.4.1 Regeneration der Thrombozyten (d-1 bis d+56)

Die Thrombozytenzahlen sanken innerhalb der ersten zehn Tage in allen Tieren auf $< 20 \times 10^9/l$ und regenerierten bis zum Ende der Immunsuppression wieder in den Normalbereich, unabhängig von der Applikationsform. Der Tiefstwert (Nadir) der Thrombozyten betrug sowohl in der IV- als auch in der IBM-Gruppe $0 \times 10^9/l$ und trat in beiden Gruppen im Median an Tag d+10 (10-11, (Min-Max)) auf. Die Phase der kritischen Thrombozytopenie ($< 20 \times 10^9/l$) mit erhöhtem Blutungsrisiko betrug neun Tage nach IV-HSZT und fünf Tage nach IBM-HSZT (siehe Tabelle 12). In der IV-Gruppe zeigten die Hunde 3 und 7 eine Auffälligkeit, da deren Thrombozytopeniephase im Vergleich zu den anderen Tieren der Gruppe länger andauerte. Diese zwei Hunde erhielten unterstützend Bluttransfusionen (Hund 3 = 2, Hund 7 = 1) um die Blutungsneigung zu minimieren (siehe Tabelle 13). Die Gabe von Vollblutspenden für diese beiden Tiere ist durch einen kurzzeitigen Anstieg und Wiederabfall der Thrombozytenzahlen gekennzeichnet und ist in der Abbildung 12 ersichtlich. Die Regeneration der Thrombozyten wurde im Median ab Tag d+19 (IV) und d+15 (IBM) beobachtet (siehe Tabelle 12) ($p = ns$).

Tabelle 12: Thrombozyten: Dauer der Zytopenie und Zeitpunkt der Regeneration

IV			IBM		
Hund	Dauer der Zytopenie [Tage]	Regeneration [Tag nach HSZT]	Hund	Dauer der Zytopenie [Tage]	Regeneration [Tag nach HSZT]
1	6	d+16	1	3	d+12
2	4	d+13	2	5	d+15
3	23	d+31	3	5	d+15
4	10	d+19	4	12	d+22
5	5	d+15	5	10	d+19
6	9	d+19	6	4	d+14
7	21	d+30	8	4	d+13
Median	9	d+19	Median	5	d+15

p-Werte (IV vs. IBM) ns für alle Zeitpunkte und Kompartimente

Hund 7 (IBM) ist an d+15 nach HSZT verstorben und wurde nicht ausgewertet.

Die Verläufe der hämatopoetischen Regeneration der Hunde 3 und 4 der IV-Gruppe und der Hunde 1 und 2 der IBM-Gruppe, welche schwache Transplantate mit geringen CD34⁺-Zellzahlen erhielten (siehe Tabelle 11), sind in der Abbildung 12 als rote Linien gezeigt.

Ergebnisse

Die Regeneration der Hämatopoese dieser vier Hunde verlief ähnlich im Vergleich zu den Tieren, die mehr als $2,0 \times 10^6/\text{kg}$ CD34⁺-Zellen infundiert bekamen.

Somit konnte für die Regeneration der Hämatopoese kein signifikanter Unterschied zwischen der IV- und IBM-Gruppe festgestellt werden.

Zusammenfassend erfolgte bei allen Tieren eine vollständige Regeneration der Blutbildung mit Normalisierung der Leuko- und Thrombozytenwerte bis Tag d+56 nach HSZT.

Bluttransfusionsbedarf

Bei einer Reduktion der Anzahl der Thrombozyten im Blut auf $< 20 \times 10^9/\text{l}$ wurden die Tiere besonders auf Blutungszeichen hin untersucht. Bei Erfüllung der Transfusionskriterien (3.9.3) erfolgte die Transfusion von bestrahltem Vollblut. In dieser Versuchsreihe benötigten während der frühen Posttransplantationsphase bis Tag d+35 vier Tiere der IV-Gruppe je ein bis zwei Bluttransfusionen (siehe **Tabelle 13**) und in der IBM-Gruppe bekam Hund 5 eine Substitution mit Vollblut.

Tabelle 13: Anzahl der Bluttransfusionen während der frühen Posttransplantationsphase

Hund	IV							IBM						
	1	2	3	4	5 ^a	6 ^b	7	1	2	3	4	5	6	8
Bluttransfusion [n]	-	1	2	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-

verstorbene Hunde: a) d+168 (GvHD), b) d+79 (Hämolyse)

Die regelmäßige Bestimmung der Hämatokritwerte erfolgte parallel zu anderen Blutparametern im Rahmen der klinischen Untersuchungen während der gesamten Posttransplantationsphase von 112 Tagen. In beiden Gruppen wurde ein Abfall der Hämatokritwerte unterhalb des unteren Referenzwertes von 0,44 l/l für jeden Hund ermittelt. Allerdings sanken die Werte nicht in einen klinisch bedeutsamen Bereich ab ($< 0,25$ l/l), so dass keine medizinischen Interventionen notwendig waren. Alle Hunde zeigten eine Normalisierung ihrer Hämatokritwerte bezogen auf ihre Ausgangswerte bis d+112 (siehe Abbildung 13).

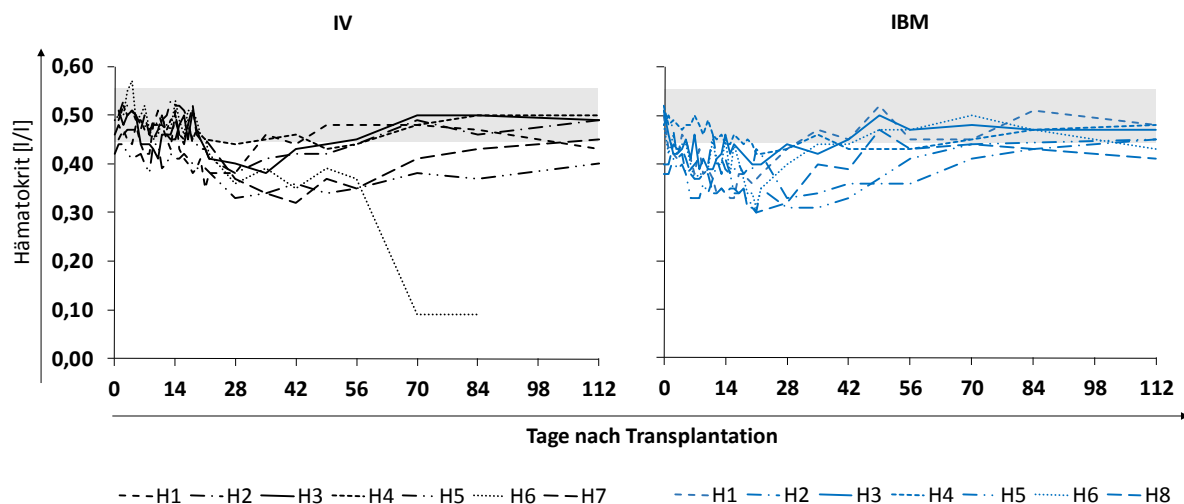


Abbildung 13: Hämatokritverlauf nach IV- und IBM-HSZT

Der Verlauf der Hämatokritwerte über einen Zeitraum von 112 Tagen nach IV- und IBM-HSZT. Die grau markierte Fläche stellt den Referenzbereich von 0,44 – 0,57 I/I für Hunde dar. Die IV-transplantierten Tiere sind als Linien in Schwarztönen gezeigt und die Linien der IBM-Gruppe in blau. Die einzelnen Linien stehen für je einen Hund (H1-H8).

Eine Ausnahme bildete Hund 6, der IV-Gruppe. Dieser zeigte ab d+69 einen akuten Abfall des Hämatokrits auf 0,13 I/I (siehe Abbildung 13). Das Erscheinungsbild der Anämie wurde zusätzlich anhand sehr blasser Schleimhäute des Hundes bestätigt. Eine Verminderung des Thrombozytenwertes konnte zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht nachgewiesen werden. Als Therapiemaßnahme erhielt dieser Hund bis Tag d+79 insgesamt fünf Bluttransfusionen, welche unterstützend einen weiteren Abfall des Hämatokrit-, Hämoglobin- und Thrombozytenwertes entgegenwirken sollten. Aufgrund eines Laktatdehydrogenase und Bilirubin Anstiegs wurde die Verdachtsdiagnose einer Hämolyse gestellt. Allerdings erzielte die Behandlung dieser transplantationsassoziierten Immunhämolyse durch die Gabe von Vollblut im Verlauf des Versuches keine Verbesserung des Gesundheitszustandes des Tieres. Aufgrund der rapiden Verschlechterung des klinischen Allgemeinzustandes des Hundes musste dieser an Tag d+79 euthanasiert werden.

4.4.2 Regeneration der Leukozyten (d-1 bis d+56)

Der Nadir von $0,4 \times 10^9/l$ ($0,1 - 0,6 \times 10^9$, (Min-Max)) in der IV-Gruppe und von $0,2 \times 10^9/l$ ($0,1 - 0,3 \times 10^9$, (Min-Max)) in der IBM-Gruppe wurde unabhängig vom Transplantationsprotokoll im Median an Tag d+7 (7 - 9, IV; 7 - 8, IBM, (Min-Max)) nach HSZT

erreicht. Der Zeitraum der Leukozytopenie betrug nach IV-HSZT im Median fünf Tage und nach IBM-Applikation des Knochenmarks sechs Tage (siehe Tabelle 14). Der Zeitpunkt der Regeneration der Leukozyten, war in der IV-Gruppe im Median an Tag d+10 und nach IBM-HSZT an Tag d+11 zu verzeichnen.

Tabelle 14: Leukozyten: Dauer der Zytopenie und Zeitpunkt der Regeneration

IV			IBM		
Hund	Dauer der Zytopenie [Tage]	Regeneration [Tag nach HSZT]	Hund	Dauer der Zytopenie [Tage]	Regeneration [Tag nach HSZT]
1	6	d+12	1	8	d+13
2	6	d+11	2	6	d+11
3	5	d+10	3	7	d+12
4	4	d+10	4	11	d+16
5	4	d+9	5	6	d+11
6	5	d+11	6	4	d+9
7	4	d+9	8	4	d+10
Median	5	d+10	Median	6	d+11

Hund 7 (IBM) ist an d+15 nach HSZT verstorben und wurde daher für diese Auswertung zensiert

4.4.3 Regeneration der leukozytären Subpopulationen (d-1 bis d+112)

Die Bestimmung leukozytärer Subpopulationen zusätzlich zum Leukozytenwert erfolgte im Zuge der Arbeit über den gesamten Posttransplantationszeitraum, um einen Nachweis der aktuellen Immunabwehr des Empfängers zu erhalten. Die Referenzwerte der gemessenen leukozytären Untergruppen bezogen auf den Leukozytenwert ($6,0 - 12,0 \times 10^9/l$) sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Übersicht der Referenzwerte der untersuchten leukozytären Subpopulationen

Parameter		Referenzwert [$\times 10^9/l$]	Referenzwert [%]
CD4/CD8		1,13 – 2,31	
T-Helferzellen	CD4 ⁺	1,90 – 5,23	31,0 -44,0
Zytotoxische T-Zellen	CD8 ⁺	0,90 – 3,72	15,0 – 31,0
Monozyten	CD14 ⁺	0,00 – 0,48	0,0 – 4,0
B-Zellen	CD21 ⁺	0,36 – 2,28	6,0 – 19,0

T-Zellen

Nach erfolgter HSZT sanken die Werte der T-Zellzahlen bei allen Hunden unterhalb des unteren Referenzbereichs. Schon an Tag d+7 verringerten sich die CD4⁺-Zellzahlen (Referenzwert: $1,90 - 5,23 \times 10^9/l$) im Median auf $0,15 \times 10^9/l$ ($0,03 - 0,30 \times 10^9/l$, (Min – Max)) in der IV- Gruppe und auf $0,10 \times 10^9/l$ ($0,07 - 0,15 \times 10^9/l$, (Min – Max)) in der IBM-Gruppe. Der CD4⁺-Anteil der Leukozyten verminderte sich somit nach einer Woche im Median um das 12-fache (IV) und nach IBM-Applikation um mehr als das 19-fache gegenüber dem unteren Referenzwert (siehe Abbildung 14).

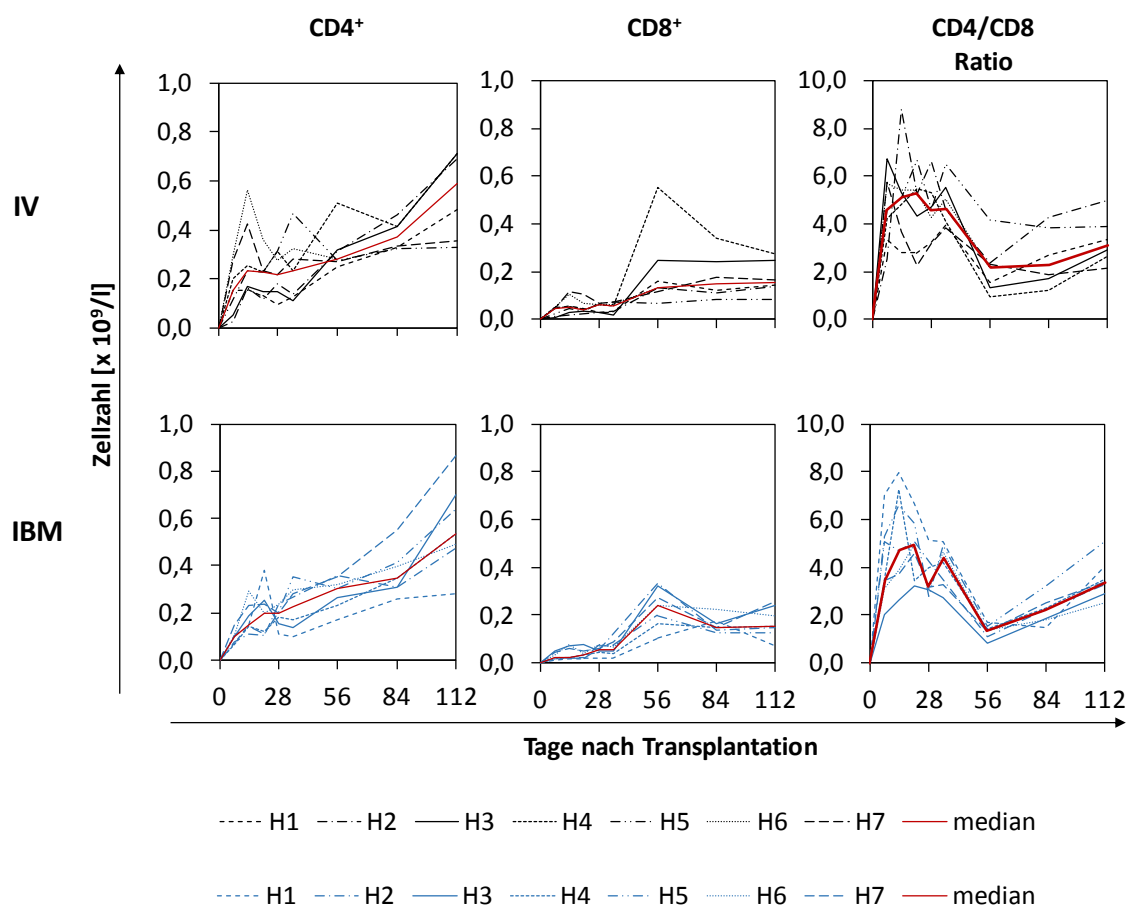


Abbildung 14: Veränderung des CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nach allogener HSZT

Es sind die absoluten Zellzahlen der Leukozyten, der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen und die CD4/CD8-Ratio aller Hunde mit entsprechendem Median (rot) nach IV- und IBM-HSZT dargestellt. Die Daten der IV-Gruppe sind in schwarzen und die der IBM-Gruppe in blauen Linien gezeigt.

Die CD8⁺-Werte (Referenzwert: $0,90 - 3,72 \times 10^9/l$) lagen nach sieben Tagen median bei $0,05 \times 10^9/l$ ($0,01 - 0,05 \times 10^9/l$, (Min - Max)) in der IV-Gruppe und bei $0,02 \times 10^9/l$

Ergebnisse

(0,01 - 0,05 x 10⁹/l, (Min - Max)) nach der IBM-HSZT. Für die CD8⁺-Zellen fielen die Werte im Median um das 18-fache (IV) bzw. um das 45-fache (IBM) bezogen auf den unteren Normwert. Eine Erholung der CD4⁺- und CD8⁺-Zellenzahlen konnte innerhalb des Beobachtungszeitraumes nachgewiesen werden jedoch nicht auf den Normalwert (siehe Abbildung 14).

Die errechnete mediane CD4/CD8-Ratio (Referenzwert: 1,13 – 2,31) stieg an Tag d+7 nach erfolgter HSZT in der IV-Gruppe auf 4,6 und in der IBM-Kohorte auf 3,5. Der genannte Referenzwert wurde in den beiden Gruppen median an Tag d+56 und Tag d+84 erzielt, nochmals gefolgt von einem langsamen moderaten Anstieg der Ratio auf 3,1 (IV) und 3,4 (IBM) zum Zeitpunkt d+112.

Monozyten

In Hinblick auf die Monozytenzellzahlen (CD14⁺-Zellen), deren Referenzwert bei 0,00 - 0,48 x 10⁹/l liegt, konnte keine signifikanten Veränderungen nach der IV- oder IBM-HSZT über die gesamten 112 Tage nachgewiesen werden. Die medianen Zellzahlen für den Gesamtzeitraum von 0,38 x 10⁹/l (0,04 - 0,52 x 10⁹/l, (Min - Max)) in der IV-Gruppe und 0,45 x 10⁹/l (0,03 - 0,61 x 10⁹/l, (Min - Max)) in der IBM-Gruppe blieben konstant im Referenzbereich (siehe Abbildung 15). Die absoluten CD14⁺-Zellzahlen stiegen bei dem Hund 5 mit dem Auftreten der GvHD (d+52) steil an, sodass an Tag d+56 eine 6-fache Erhöhung im Vergleich zum oberen Referenzwert (0,48 x 10⁹/l) gemessen wurde.

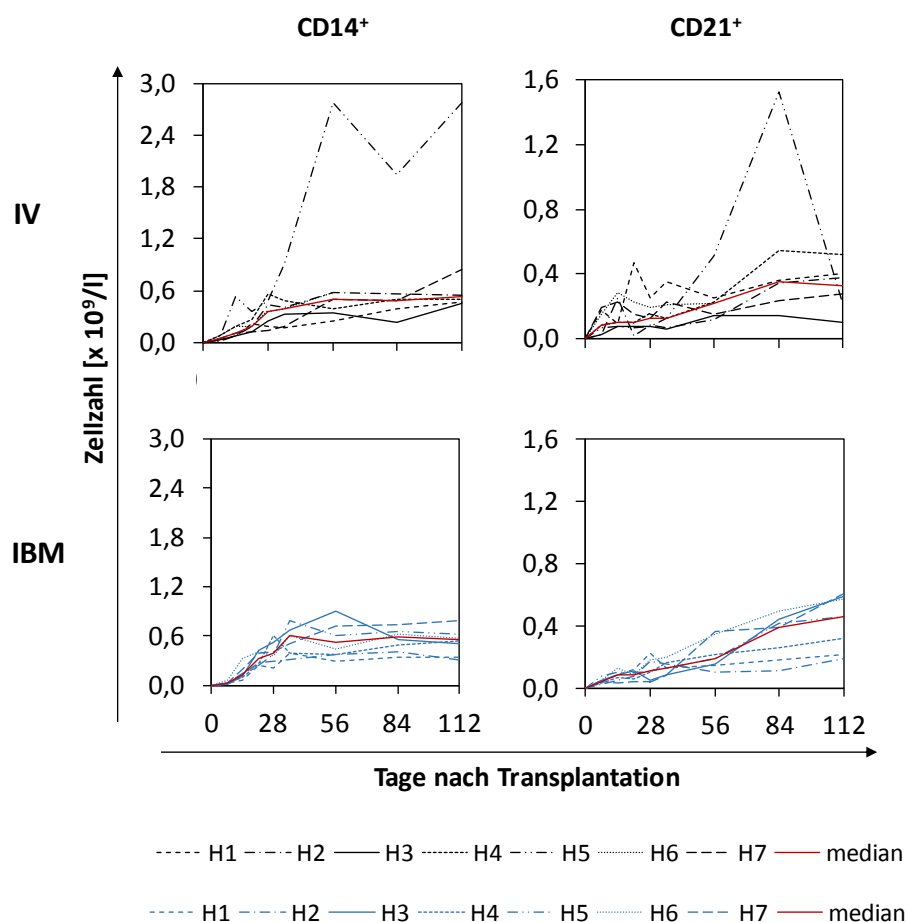


Abbildung 15: Veränderungen der Monozyten und B-Zellzahlen nach allogener HSZT

Die Entwicklung der absoluten Zellzahlen von Monozyten (CD14⁺) und B-Zellen (CD21⁺) im peripheren Blut nach der HSZT. Die Verläufe jedes Hundes (IV = schwarz; IBM = blau) sind als Einzellinien dargestellt. Der Median pro Gruppe ist als rote Linie gezeigt.

B-Zellen

Die B-Zellen (CD21⁺-Zellen) verringerten sich, bezogen auf den Referenzwert (0,36 - 2,28 x 10⁹/l) während der gesamten 112 Tage nach HSZT nur geringfügig. Im Median

lagen die Werte der IV-Gruppe bei $0,13 \times 10^9/l$ ($0,08 - 0,35 \times 10^9/l$, (Min - Max)) und in der IBM-Gruppe bei $0,12 \times 10^9/l$ ($0,04 - 0,46 \times 10^9/l$, (Min - Max)). Zu dem Zeitpunkt Tag d+112 erholten sich die CD21⁺-Zellzahlen der IBM-Gruppe im Median mit $0,46 \times 10^9/l$ wohingegen die medianen CD21⁺ Zellzahlen der IV-Gruppe bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht in den Normbereich zurückkehrten.

4.4.4 Regeneration der Erythropoese (d-1 bis d+112)

Die Erythrozytenzellzahlen zeigten für die meisten Tiere nach erfolgter HSZT keine klinisch relevanten Veränderungen auf. Im Hinblick auf den Zeitraum der Immunsuppression (bis d+35) waren im Gegensatz zu den Thrombozytenzellzahlen keine signifikanten Erniedrigungen der Werte zu beobachten. Nachfolgend erlangten die Erythrozyten bis zum Tag d+112 sowohl nach der IV- als auch nach der IBM-HSZT wieder ihren Ausgangswert. Lediglich Hund 6 der IV-Gruppe, welcher eine transplantationsassoziierte Hämolyse hatte, wies einen steilen Abfall der Erythrozytenzellzahlen auf (siehe Abbildung 16).

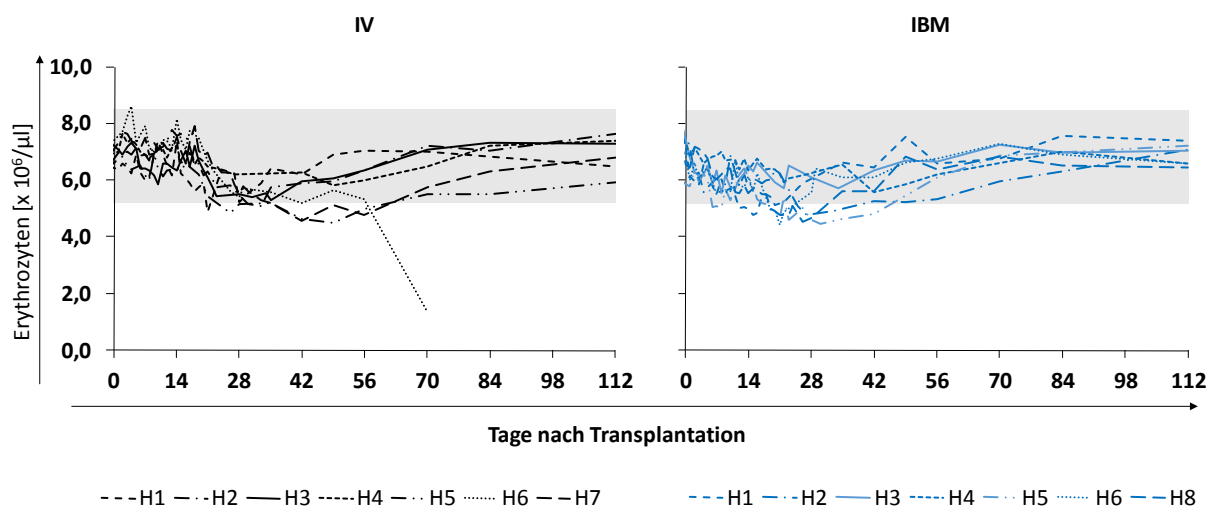


Abbildung 16: Verlauf der Erythrozytenzellzahlen während der gesamten Posttransplantationsphase

Verlauf der Regeneration der Erythropoese über einen Zeitraum von 112 Tagen nach IV- und IBM-HSZT. Die grau markierte Fläche stellt den Referenzbereich der Erythrozytenwerte für Hunde dar. Die Ergebnisse der IV-transplantierten Tiere sind als Linien in Schwarztönen gezeigt und die Linien der IBM-Gruppe in blau. Die einzelnen Linien stehen für je einen Hund (H1-H8).

4.5 Entwicklung des Spenderchimärismus in den verschiedenen Blutkompartimenten

Die Entwicklung des Spenderchimärismus nach der HSZT gibt Auskunft über den Erfolg des Transplantatanwachsens. Zur Analyse wurden aus dem peripheren Blut die Zellpopulationen der PBMC und der Granulozyten untersucht.

Sowohl in der IV- als auch in der IBM-Gruppe konnte für jedes Tier ein initiales Anwachsen des Transplantates bereits ab dem ersten Untersuchungszeitpunkt d+7 festgestellt werden. In der Tabelle 16 ist das mediane Transplantatanwachsen in der sehr frühen (d+7, d+14) und späteren Posttransplantationsphase (d+56, d+112) nach IV- und IBM-Applikation gezeigt. In beiden Gruppen ist ein rasches Transplantatanwachsen zu verzeichnen. So entwickelte sich in den Granulozyten beider Gruppen bereits nach den ersten zwei Wochen ein fast kompletter Spenderchimärismus, der bis zum Zeitpunkt d+112 stabil blieb. Für die PBMC wurde ein längerer gemischter Spenderchimärismus festgestellt, wobei dessen Entwicklung sowohl nach der IV- als auch nach der IBM-HSZT in den ersten 14 Tagen ähnlich verlief. Dieser war im Gesamtverlauf durch eine Zunahme des Spenderanteils charakterisiert.

Tabelle 16: Spenderchimärismus in der sehr frühen und späteren Posttransplantationsphase

		sehr frühes Transplantatanwachsen		späteres Transplantatanwachsen	
		d+7	d+14	d+56	d+112
Granulozyte	IV	7 % (5-92 %)	100 % (93-100 %)	98 % (54-100 %)	97 % (3-100 %)
	IBM	33 % (11-83 %)	99 % (59-100 %)	96 % (79-100 %)	100 % (86-100 %)
PBMC	IV	22 % (15-54 %)	35 % (17-93 %)	57 % (39-100 %)	78 % (26-100 %)
	IBM	21 % (8-34 %)	48 % (55-73 %)	82 % (54-99 %)	86 % (72-92 %)

p-Werte (IV vs. IBM) ns für alle Zeitpunkte und Kompartimente

In den Granulozyten blieb der Spenderchimärismus auch für die späteren Zeitpunkte d+56 und d+112 auf konstant hohem Niveau, sodass bis zum Ende der Beobachtungszeit ein nahezu kompletter Spenderchimärismus in beiden Transplantationsgruppen nachgewiesen werden

konnte. Im Vergleich dazu zeigte sich in den PBMC hingegen zum Zeitpunkt d+56 und d+112 ein weiterhin gemischter Spenderchimärismus, welcher bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes einen kontinuierlich steigenden Spenderanteil aufwies (Ausnahmen: Hund 3 und 7 der IV-Gruppe).

Zur Diagnostik erfolgte eine viermalige Analyse des Spenderchimärismus aus dem Knochenmark. Der Spenderanteil im Knochenmark erlangte zu den verschiedenen Zeitpunkten stets einen ähnlichen Prozentsatz wie er in den Granulozyten aufgezeigt wurde. Nach vier Wochen konnte ein Niveau von über 90 % Spenderchimärismus nach beiden Applikationsmethoden bestimmt werden, welches über die nachfolgenden 12 Wochen konstant beibehalten wurde. Der Vergleich der Anwachsrate zwischen IV- und IBM-HSZT ergab in den Granulozyten, den PBMC und dem Knochenmark keine signifikanten Unterschiede. Die Darstellung der Entwicklung des Spenderchimärismus in der Abbildung 17 deutet darauf hin, dass die zwei Hunde 3 und 7 aus der Kontrollgruppe in der späteren Phase nach der HSZT eine Abstoßung des Transplantates erlitten.

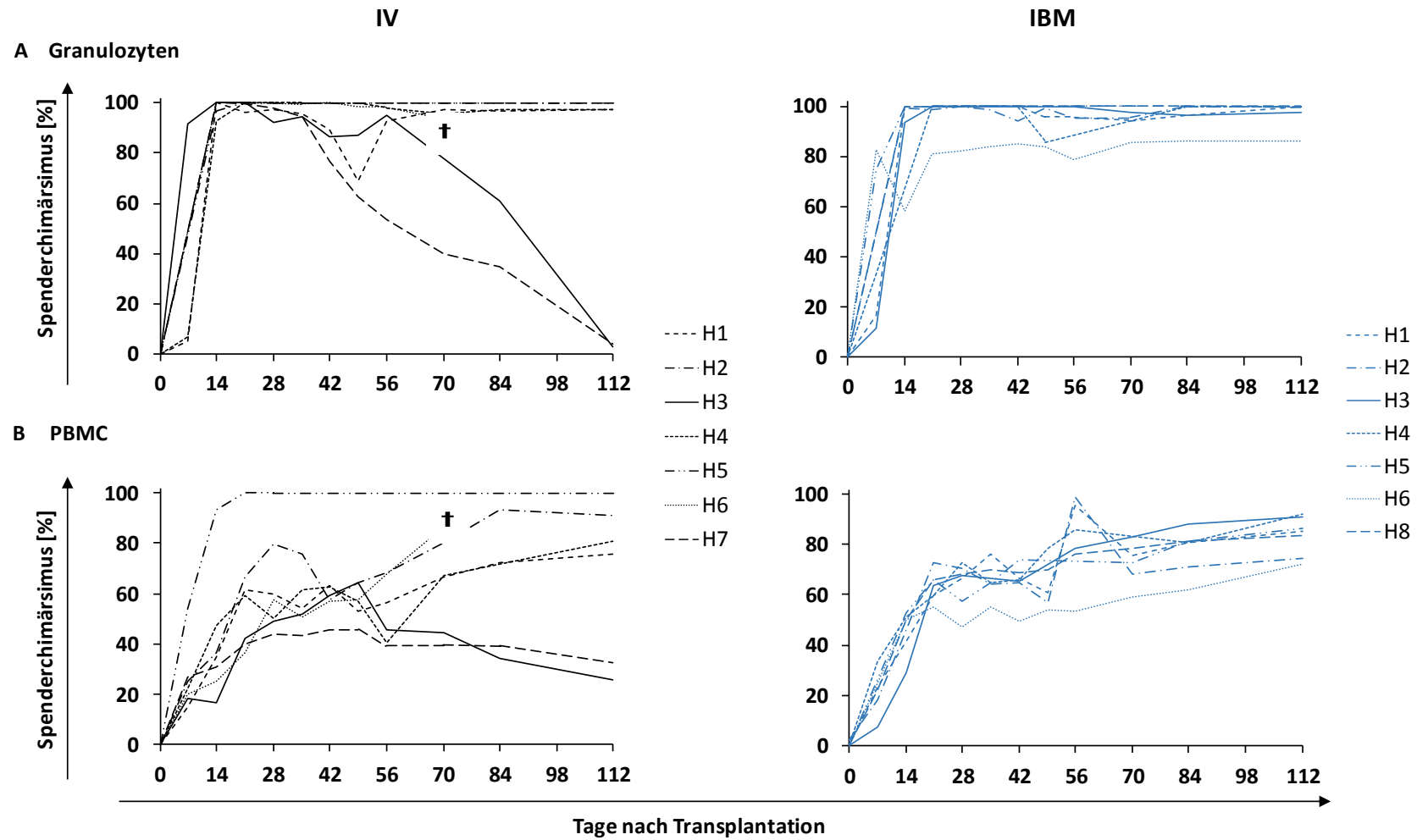


Abbildung 17: Entwicklung des Spenderchimärismus in den PBMC und Granulozyten nach IV- und IBM-HSZT

Die Untersuchung des Spenderchimärismus wurde an definierten Zeitpunkten während des 16 wöchigen Beobachtungszeitraums durchgeführt. Dargestellt sind die Spenderchimärismen in den Granulozyten und den PBMC Kompartimenten. Die Ergebnisse der IV-transplantierten Tiere sind als Linien in Schwarztönen gezeigt (links) und die Linien der IBM-Gruppe in blau (rechts).

Ergebnisse

Eine vollständige Abstoßung konnte für den Hund 3 zu einem späteren, außerhalb des Beobachtungszeitraumes liegenden Zeitpunkt, d+161, bestätigt werden. Der Hund 7 stabilisierte seine Spenderhämatopoese nach dem regulären Beobachtungszeitraum wieder und wies am letzten verfügbaren Probenentnahmezeitpunkt (d+168) einen gemischten Spenderchimärismus von 27 % (Granulozyten), 40 % (PBMC) und 24 % (Knochenmark) auf. In der IBM Gruppe stieß kein Hund sein Transplantat ab.

Als Besonderheit in der Entwicklung des Spenderchimärismus ist Hund 5 der IV-Gruppe zu nennen, dieser entwickelte ab dem Zeitpunkt d+52 eine GvHD auf, welche mit einem auffälligen Kurvenverlauf insbesondere in den PBMC korrelierte. So konnte schon ab d+14 ein nahezu 100-prozentiger Spenderanteil gemessen werden, der im weiteren Verlauf unverändert blieb.

Zusammenfassend konnte bis zum Ende des festgelegten Untersuchungszeitraums in der IV-Gruppe in 6/7 und in der IBM-Kohorte in 7/7 evaluierbaren Tieren ein Spenderchimärismus nachgewiesen werden.

4.6 Einfluss der Transplantatzusammensetzung auf den Grad des Spenderchimärismus

Die zelluläre Zusammensetzung des applizierten Knochenmarks bzw. des Buffy-Coats für die jeweiligen Tiere wurde auf den Anteil an TNC, CD34⁺-, CD3⁺- und CD14⁺-Zellen überprüft. Inwieweit die einzelnen Zellpopulationen einen Einfluss auf das Transplantatanwachsen haben, ist in den Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt.

Für die Analyse des Chimärismus bezogen auf die infundierten TNC wurde eine Einteilung in Transplantate mit $\leq 3,0 \times 10^8$ TNC/kg KGW oder $> 3,0 \times 10^8$ TNC/kg KGW vorgenommen. In der IV-Gruppe erhielten 2/7 (Hund 2 und 3) und in der IBM-Gruppe ebenfalls 2/7 Hunden (Hund 2 und 3) Transplantate mit $\leq 3,0 \times 10^8$ TNC/kg KGW erhielten. Den verbleibenden Tieren wurden jeweils Transplantate mit einer höheren TNC-Zellzahl (siehe Abbildung 18 A) appliziert. Mit Ausnahme des Hundes 3 der IV-Gruppe konnte in allen Tieren eine ähnliche Entwicklung des Spenderchimärismus beobachtet werden, welche unabhängig von der Anzahl transplanterter TNC war. Der Verlauf bei Hund 3, der IV-Gruppe war auffällig, da ab Tag d+56 ein Abfall der Spenderchimärismsrate in den Granulozyten sowie der PBMC zu messen war. Der Verdacht, dass eine Transplantatabstoßung vorliegt, konnte jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt, außerhalb des Beobachtungszeitraumes (d+161,) bestätigt werden. Dieser Hund erhielt das Transplantat mit den geringsten TNC- und CD34⁺-Zellzahlen und generell niedrige Zellzahlen aller vier Zellpopulationen. Wohingegen der Hund 2 aus der IBM-Kohorte ebenfalls für alle vier Zellpopulationen niedrige Werte im Transplantat aufzeigte, dieser jedoch stabile Spenderchimärismsraten entwickelte und beibehielt.

Des Weiteren kam es bei Hund 7 der IV-Gruppe zu einem starken Abfall im Spenderchimärismus der Granulozyten. Der PBMC-Spenderchimärismus hingegen zeigte einen deutlich langsameren, geringfügigen Abstieg. Eine Abstoßung des Transplantates konnte jedoch bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nicht beobachtet werden. Bei der Transplantatzusammensetzung wurde ein geringer Anteil an CD3⁺-Zellen gemessen, die anderen drei Zellpopulationen waren mit höheren Zellzahlen assoziiert. Eine Abstoßung des Transplantates erfolgte nicht. Dem gegenüber konnte für alle weiteren Hunde eine von den TNC-Zellzahl unabhängige stabile Verlaufskurve nachgewiesen werden.

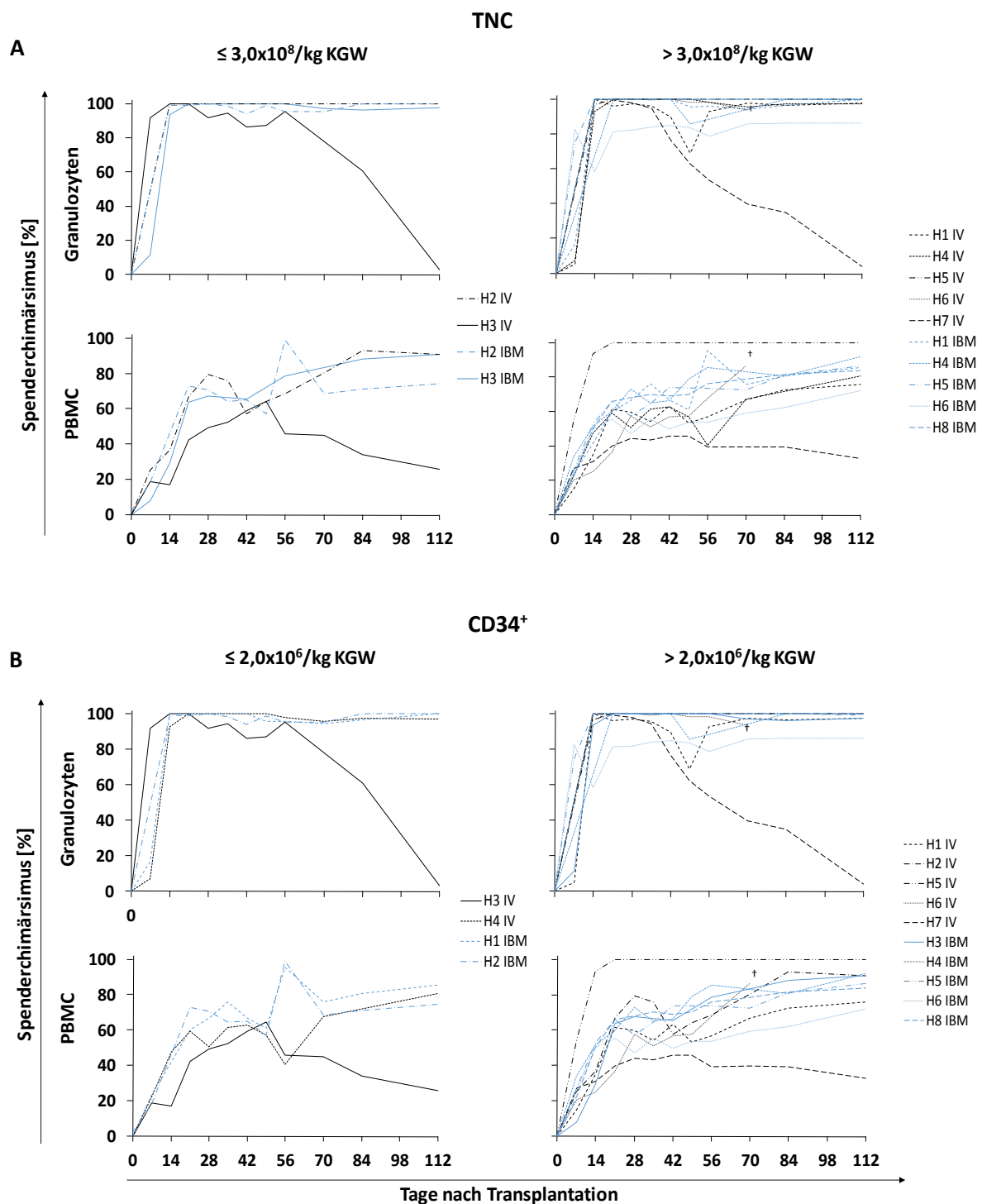


Abbildung 18: Spenderchimerismus in Abhängigkeit von den TNC und CD34⁺-Zellzahlen im Transplantat

In der Grafik ist die Entwicklung der Spenderchimerismen der Granulozyten und der PBMC über den gesamten Beobachtungszeitraum nach HSZT dargestellt. Auf der linken Seite sind die Verläufe mit geringen und auf der rechten die mit höheren Zellzahlen im Transplantat abgebildet. Abbildung A zeigt den Spenderchimerismus in Abhängigkeit von der TNC-Zellzahl. Abbildung B stellt den Spenderchimerismus bezogen auf den Anteil an CD34⁺-Zellen dar. IV = schwarz, IBM = blau

Aus der humanen Situation ist bekannt, dass eine $CD34^+$ -Anzahl von $> 2,0 \times 10^6/\text{kg KGW}$ vorhanden sein sollte, um ein erfolgreiches Anwachsen zu erzielen. In dieser Arbeit erhielten jeweils zwei Tiere pro Gruppe (IV: Hund 3 und 4; IBM: Hund 1 und 2) ein sogenanntes „schwaches“ Transplantat ($\leq 2 \times 10^6$ $CD34^+$ -Zellen/kg KGW). Die Entwicklung des Spenderchimärismus in Abhängigkeit der $CD34^+$ -Zellzahl ist in der Abbildung 18 B gezeigt.

Es wird deutlich, dass mit einer geringen Zellzahl ($\leq 2,0 \times 10^6/\text{kg KGW}$) nach IV- und IBM-HSZT ein erfolgreiches Anwachsen möglich war. So waren die Raten des Spenderchimärismus in den Granulozyten und den PBMC vergleichbar mit Tieren aus den Gruppen, die eine höhere Anzahl an $CD34^+$ -Zellen appliziert bekamen.

Hinsichtlich des Einflusses der Monozytenzellzahlen auf den Grad des Spenderchimärismus konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden. Insgesamt wurden in 3/7 Hunden der IV-Gruppe und 2/7 Hunden der IBM-Gruppe geringe Monozytenzellzahlen ($\leq 2,0 \times 10^7/\text{kg KGW}$) transplantiert. Die verbleibenden neun Hunde hingegen erhielten Monozytenzellzahlen von mehr als $2,0 \times 10^7$ $CD14^+$ Zellen/kg KGW (siehe **Abbildung 19**). Es zeigte sich für jede Kategorie ein rasches Transplantatanwachsen in beiden Gruppen (siehe A).

Allerdings war an Tag d+7 der Spenderchimärismus in den PBMC der Hunde, die einen höheren Monozytenanteil ($> 2,0 \times 10^7/\text{kg KGW}$) transplantiert bekamen signifikant höher ($p = 0,03$). Ein weiterer Einfluss der Monozytenzellzahl auf die Entwicklung des Spenderchimärismus zu den anderen untersuchten Zeitpunkten konnten weder in den Granulozyten noch in den PBMC beobachtet werden.

Des Weiteren wurde der Spenderchimärismus in Abhängigkeit der T-Zellzahl ($CD3^+$) untersucht (siehe **Abbildung 19 B**). In der Gruppe mit konventioneller IV-Infusion wurden in 5/7 Hunden Transplantate mit $\leq 2,0 \times 10^7$ $CD3^+$ -Zellen/kg KGW verwendet. Zu denen zählten die zwei Hunde (IV: Hunde 3 und 7), welche eingangs bereits erwähnt im Verlauf des Versuchs einen deutlichen Abfall des Spenderchimärismus zeigten. Dem gegenüber erhielten in der IBM-Kohorte 2/7 der Hunde Transplantate mit geringer $CD3^+$ -Zellzahl.

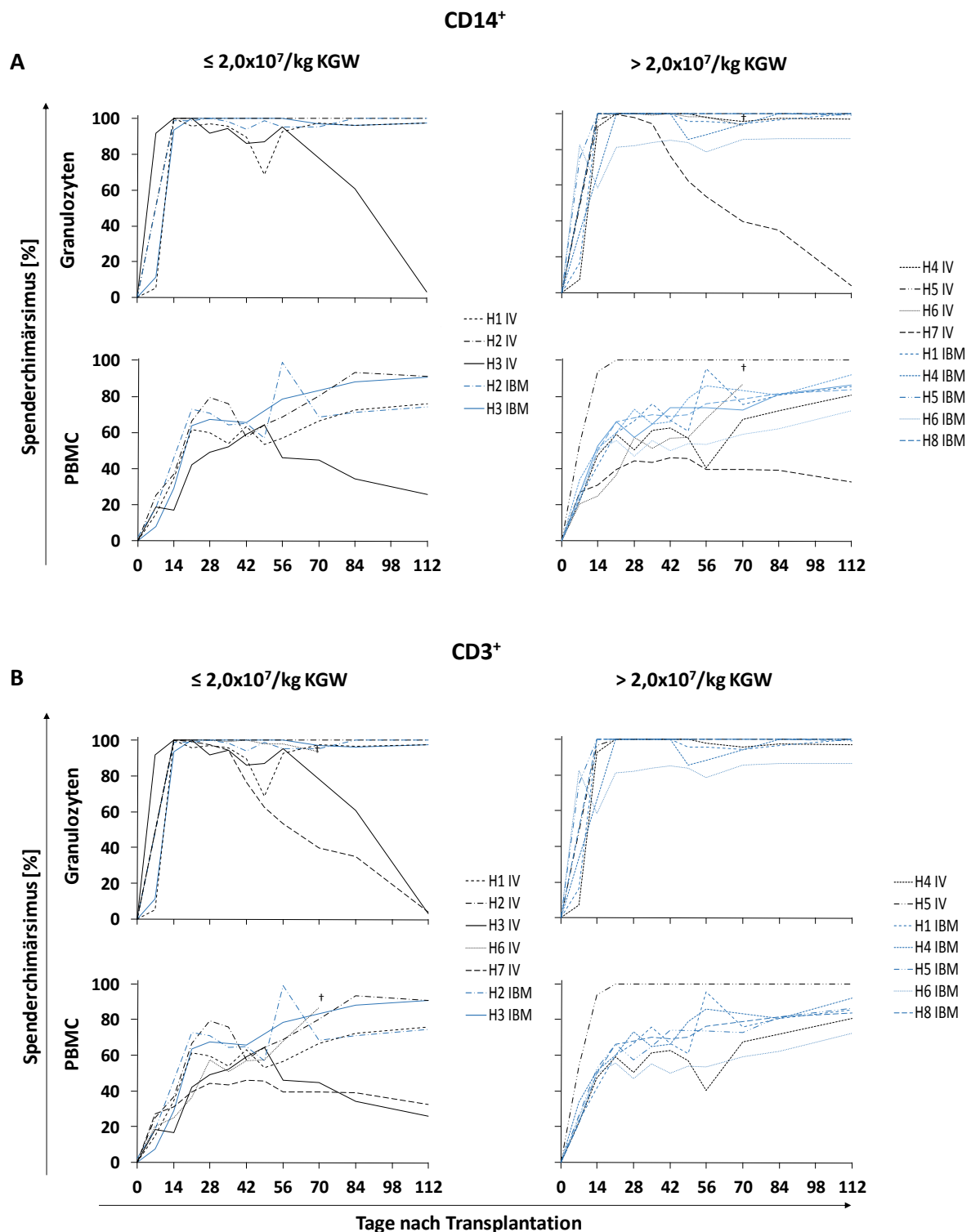


Abbildung 19: Spenderchimerismus in Abhängigkeit von den CD14⁺- und CD3⁺-Zellzahlen im Transplantat

Dargestellt ist der Verlauf der Spenderchimerismen aus den Granulozyten und den PBMC über den gesamten Beobachtungszeitraum nach HSZT. Abbildung A zeigt den Spenderchimerismus abhängig von den CD14⁺-Zellzahlen. Abbildung B stellt den Spenderchimerismus bezogen auf den

Anteil an CD3⁺-Zellen dar. Auf der linken Seite sind die Spenderchimärismen mit geringen und auf der rechten die höheren Zellzahlen abgebildet. IV = schwarz, IBM = blau.

In Bezug auf die Zellzahl im Transplantat konnte einzig an Tag d+14 in den PBMC ein signifikant höherer Spenderchimärismus für die Hunde mit einem höheren CD3⁺-Anteil ($> 2,0 \times 10^7/\text{kg KGW}$) im Vergleich zu den Hunden mit geringerem CD3⁺-Anteil im Transplantat ermittelt werden ($p = 0,001$).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie ein relevanter Einfluss der Zellzahl von unterschiedlichen Zellpopulationen des Transplantates auf das langfristige Transplantatanwachsen nicht gezeigt werden. Ebenso war bezüglich der Verwendung geringer Zellzahlen kein Vorteil der IBM-Applikation beim Transplantatanwachsen im Vergleich zur IV-Methode nachzuweisen. So entwickelte die Mehrheit der Tiere innerhalb der ersten 14 Tage einen hohen Spenderchimärismus unabhängig von den transplantierten Zellzahlen. Lediglich der Hund 3 der IV-Gruppe, welcher das Transplantat mit den niedrigsten TNC- und CD34⁺-Zellzahlen erhielt und als einziger Hund sein Transplantat abstieß, deutete tendenziell auf einen Einfluss der zellulären Zusammensetzung des Transplantates auf ein erfolgreiches stabiles Anwachsen hin.

4.7 Therapieassoziierte Toxizität

In Folge der allogenen HSZT können Komplikationen auftreten, die unter anderem lebensbedrohlich sein können. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie kam es insgesamt zu drei Todesfällen, wobei zwei Tiere aus der IV-Gruppe (Hund 5 und 6) und eines aus der IBM-Gruppe (Hund 7) verstarben.

Hund 5 der IV-Gruppe zeigte zudem eine Besonderheit auf. So entwickelte er an Tag d+52 eine GvHD, welche zu den häufigsten auftretenden Nebenwirkungen nach einer HSZT zählt, allerdings im Geschwister-Hundemodell sehr selten ist. Eine Einzelbetrachtung dieses speziellen Krankheitsfalls folgt im Kapitel 4.7.2.

Bei dem zweiten Tier der IV-Gruppe (Hund 6) konnte an Tag d+69 ein Auftreten einer transplantationsassoziierten Immunhämolyse beobachtet werden. Selbst die Gabe von fünf Bluttransfusionen brachte keine Verbesserung des Gesundheitszustandes des Tieres, woraufhin es an d+79 euthanasiert werden musste (siehe 4.4.1).

In der IBM-transplantierten Gruppe verstarb in der frühen Posttransplantationsphase Hund 7 an d+15. Trotz der routinemäßigen Abschirmung des Hundes in der Leukozytopeniephase,

durch die prophylaktische Gabe eines Antibiotikums, entwickelte dieses Tier an d+14 Fieber und verstarb in den anschließenden 24 h durch eine bakterielle Infektion.

4.7.1 Klinischer Verlauf der frühen Posttransplantationsphase (d-1 bis d+35)

Die Bewertung der Toxizität des Konditionierungsregimes und der Immunsuppression wurde unter anderem anhand der Parameter Körpertemperatur, Gewicht, Nahrungsaufnahme, Aktivität und Stuhlgang durchgeführt. Die Evaluierung erfolgte für den Zeitraum der Immunsuppression von d-1 bis d+35. Die Körpertemperatur, das Gewicht und die Nahrungsaufnahme wurden entsprechend der definierten Graduierung (siehe 3.9.1.1) in Grad Null bis zwei eingeteilt. Für die Aktivität und den Stuhlgang existierten vier Graduierungsstufen (Grad null bis drei).

In der IV- und in der IBM-Gruppe wurden die untersuchten Parameter im Zeitraum der Immunsuppression (d-1 bis d+35) überwiegend mit Grad 0 evaluiert. Veränderungen durch die angewendete Therapie konnten für alle fünf Parameter sowohl in der IV- als auch in der IBM-Gruppe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20).

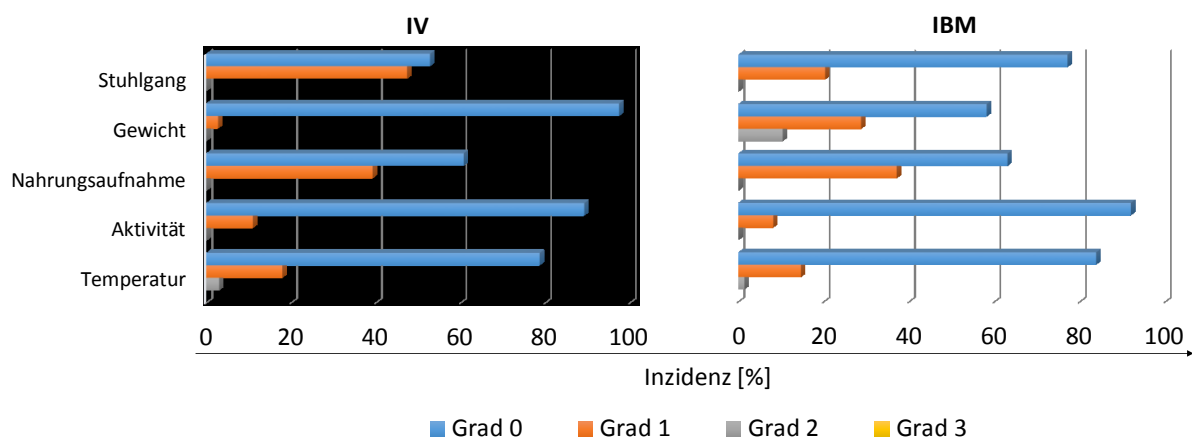


Abbildung 20: Veränderungen klinischer Parameter in der frühen Posttransplantationsphase

Die Veränderungen der Parameter zur Bewertung der Toxizität während der Phase der Immunsuppression von d-1 bis d+35 (= 100 %) für die IV-Gruppe (oben, n = 7) und die IBM-Gruppe (unten, n = 8) sind dargestellt. Es sind die prozentualen Häufigkeiten der Tage angegeben (Median) an denen die jeweiligen Toxizitätsgrade auftraten. Die Graduierungsstufen sind farblich gekennzeichnet: Grad 0 (blau), Grad 1 (orange), Grad 2 (grau) und Grad 3 (gelb).

Der Stuhlgang in der IV-Gruppe war an 53 % der Tage nicht beeinträchtigt. An 47 % der Tage hingegen wurde er mit Grad 1 als breiig, bewertet. In der IBM-Gruppe wurde hinsichtlich des

Stuhlganges median an 77 % der Tage keine Veränderung festgestellt. Demgegenüber standen allerdings median rund 20 % der Tage mit Grad 1.

Bezüglich des Gewichtes der Tiere konnte in der IV-Kohorte median an 97 % der Tage keine Veränderung nachgewiesen werden. Ein Gewichtsverlust von > 500 g in Bezug auf das Ausgangsgewicht vor HSZT wurde einzig an 3 % der Tage ermittelt. Im Vergleich war in der IBM-Gruppe im Median an 58 % der Tage das Gewicht konstant. Zu einer Gewichtsreduzierung um > 500 g kam es in dieser Gruppe an 29 % der Tage und an 10 % der Tage konnte ein Gewichtsverlust > 1000 g beobachtet werden. Insgesamt wurde zwischen der IV- und der IBM-Gruppe bezüglich des Gewichtsverlustes kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Für den Parameter Nahrungsaufnahme konnten median an 61 % (IV) bzw. 63 % (IBM) der Tage keine Auffälligkeiten festgestellt werden. An den verbleibenden 39 % (IV) und 37 % (IBM) der Tage hingegen war die Nahrungsaufnahme reduziert (Grad 1). Grad 2 und 3 konnten über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht beobachtet werden.

Die Aktivität der Tiere in beiden Gruppen war median in über 80 % der Tage als normal zu bewerten und wurde in weniger als 20 % der Tage als ruhig mit dem Grad 1 bewertet.

Hinsichtlich der Körpertemperatur konnte in jedem Hund nach erfolgter HSZT eine Veränderung beobachtet werden. Insgesamt verlief die Änderung der Körpertemperatur während der immunsuppressiven Zeit bei allen Tieren sehr einheitlich. In der IV-Gruppe war median ein Temperaturanstieg auf > 39,0 °C an 21 % der Untersuchungstage und in der IBM-Gruppe an 16 % der Untersuchungstage nachweisbar. Weiterhin konnte eine mediane Körpertemperaturerhöhung ab Tag d+15 in beiden Gruppen detektiert werden, welche nach IV-Applikation im Median 7 (1 – 10, (Min – Max)) Tage und nach IBM-HSZT 6 (2 – 10, (Min - Max)) Tage andauerte. Diese Beobachtung stand in direkter Korrelation zu den Regenerationszeiten der Leukozyten- und Thrombozyten. Diesbezüglich kann der Anstieg der Körpertemperatur als „Regenerationsfieber“ gewertet werden, welches mit der Wiederherstellung der Hämatopoese und dem Transplantatanwachsen einhergeht. Zusammenfassend wurde unabhängig von der Applikationsart bei der Gesamtoxizität kein signifikanter Unterschied ermittelt.

Die Überprüfung des CsA-Talspiegels (C₀-Wert) ergab in der IV- und in der IBM- Gruppe im Median 686 ng/ml bzw. 797 ng/ml (siehe Tabelle 17). Somit konnte von einer ausreichenden Immunsuppression durch die tägliche zweimalige Gabe von 15 mg/kg KGW CsA ausgegangen werden.

Tabelle 17: Übersicht der gemessenen CsA-Talspiegel (d-1 bis d+35)

C ₀ -Wert in ng/ml				C ₀ -Wert in ng/ml			
IV				IBM			
Hund	Median	Min	Max	Hund	Median	Min	Max
1	1158	296	1344	1	797	714	2810
2	1610	958	2634	2	984	823	1066
3	295	258	349	3	408	207	542
4	665	484	1689	4	703	495	945
5	575	140	1060	5	1293	559	3000
6	686	485	1237	6	944	902	1230
7	804	680	1150	8	316	199	432
Median	686	484	1237		797	559	1066

CsA ist nephrotoxisch, daher wurde der Creatinin- und Harnstoffspiegel bestimmt um eine mögliche Nierenschädigung beurteilen zu können. Der mediane Creatinin- und Harnstoffwert beider Gruppen lag über den gesamten Zeitraum der Immunsuppression im Normbereich (siehe Anhang Abbildung 24). Dementsprechend konnten keine schädigenden Wirkungen auf die Nieren festgestellt werden.

4.7.2 Klinischer Verlauf der späten Posttransplantationsphase (bis d+112)

In Folge einer HSZT kann es aufgrund der Ganzkörperbestrahlung sowie durch die Applikation verschiedener Medikamenten zu zahlreichen Nebenwirkungen und Begleitscheinungen kommen. Um dieser Tatsache zu begegnen und Veränderungen wichtiger Leberparameter frühzeitig erkennen zu können, wurden über die gesamte Beobachtungszeit wichtige Leberparameter wie die Leberenzyme ALAT, ASAT und AP überprüft (siehe Abbildung 21).

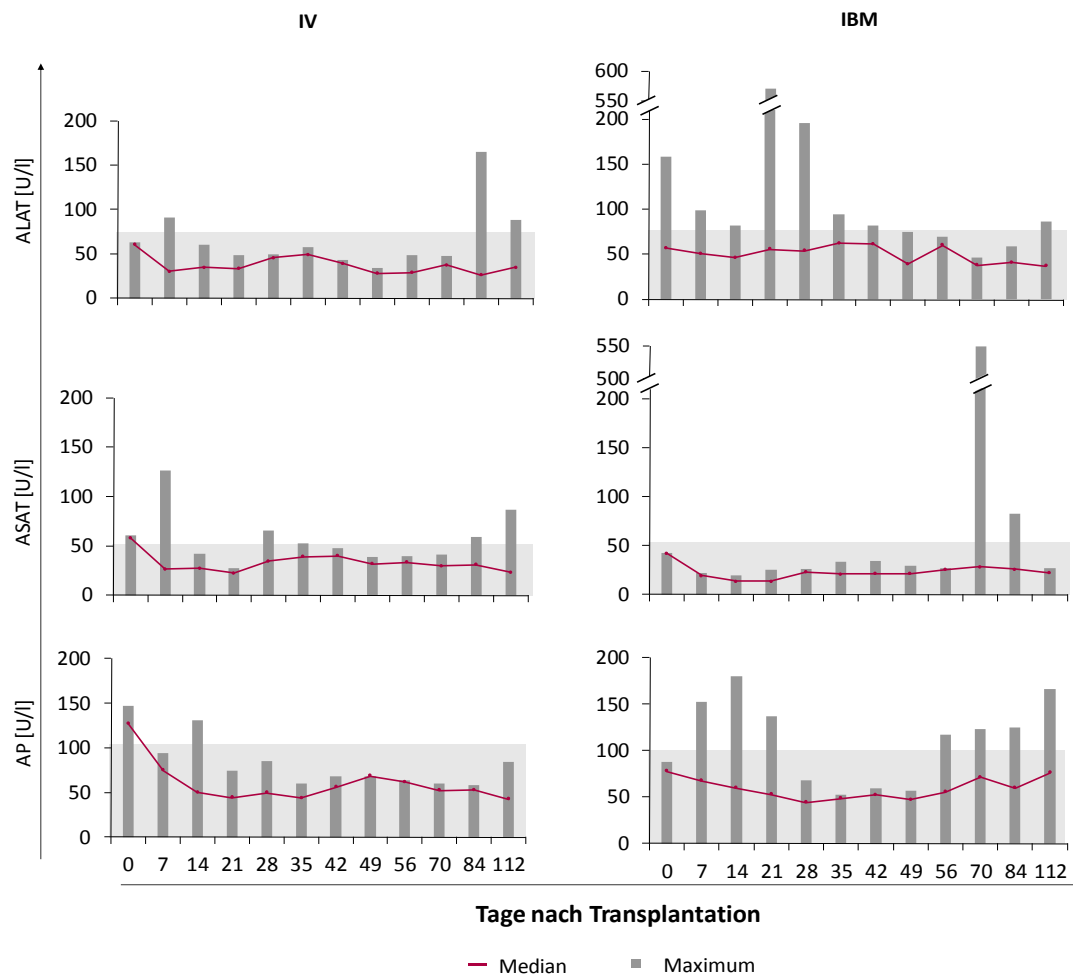


Abbildung 21: Verlauf der Leberenzyme ALAT, ASAT und der AP über die Gesamtposttransplantationszeit

Es ist der Verlauf der Leberenzyme ALAT, ASAT und AP über den gesamten Beobachtungszeitraum von 112 Tagen nach IV- und IBM-HSZT dargestellt. Die grau markierte Fläche markiert den Referenzbereich der einzelnen Leberparameter für Hunde. Die grauen Balken geben das Maximum zur magenta gezeichneten Medianlinie wieder. In der gezeigten Darstellung ist der Hund 5 (IV) aufgrund seiner GvHD nicht mit einbezogen worden.

Insgesamt konnten in der kompletten späten Posttransplantationsphase weder nach der IV- als auch nach der IBM-HSZT keine klinisch relevanten Veränderungen der Leberenzyme ALAT, ASAT und AP festgestellt werden. Alle medianen Werte lagen konstant im Normbereich. Die gemessenen Werte des GvHD erkrankten Tieres wurden nicht in die Berechnung des Medians und des Maximums einbezogen. Die Einzeldarstellung des Falls wird im Folgenden beschrieben.

4.7.3 Einzelfallbetrachtung: GvHD-Reaktion in Hund 5 der IV-Gruppe

Die Einzelfallbetrachtung des Hundes mit der GvHD-Reaktion ist in dieser Arbeit kurz dargestellt und ist zur Veröffentlichung eingereicht [96].

Die GvHD-Reaktion zählt zu einer der am häufigsten auftretenden Komplikationen im Verlauf einer HSZT und entsteht aufgrund einer zellulären Immunreaktion der Spender-T-Zellen gegen den Empfängerorganismus. Bis zum Auftreten der GvHD verlief die Regeneration der Hämatopoese bei Hund 5 unauffällig und ohne Komplikationen. Auffällig war einzig die rasche Entwicklung des Spenderchimärismus, welcher schon ab Tag d+14 sehr hohe Rate von mehr als 90 % sowohl in den Granulozyten als auch in den PBMC aufzeigte (siehe Abbildung 22).

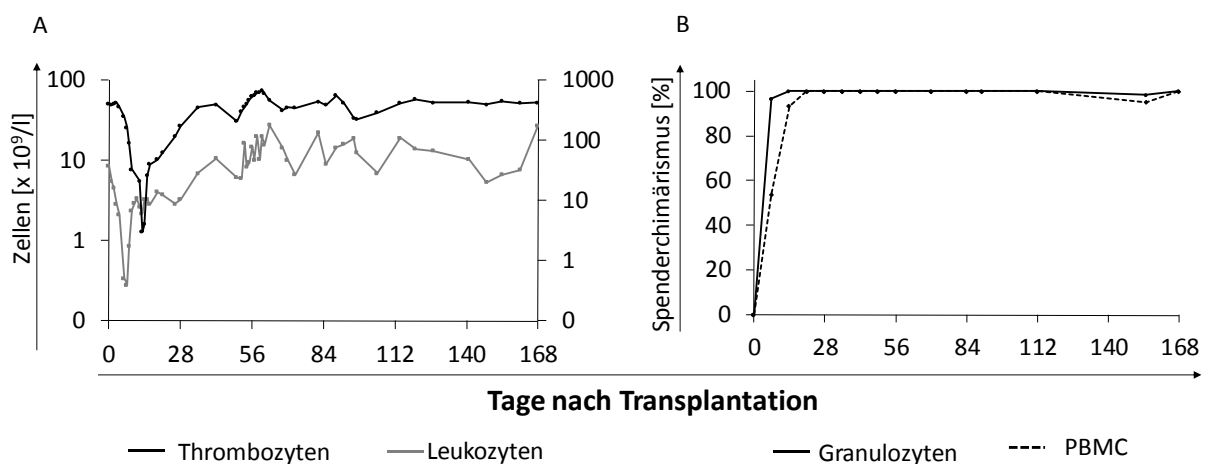


Abbildung 22: Leukozyten- und Thrombozytenverlauf sowie Entwicklung des Spenderchimärismus des Hundes mit der GvHD-Reaktion

Gezeigt ist der Verlauf der hämatopoetischen Regeneration der Leukozyten- sowie Thrombozytenwerte (A) und die Entwicklung des Spenderchimärismus (B) des Hundes 5 der IV-Gruppe mit ausgeprägter GvHD über den Untersuchungszeitraum von 168 Tagen.

Außerdem erhielt der Hund in seiner Gruppe das Transplantat mit den höchsten Zellzahlen für TNC ($5,0 \times 10^8/\text{kg KGW}$), CD34⁺ ($7,2 \times 10^6/\text{kg KGW}$), CD14⁺ ($3,6 \times 10^7/\text{kg KGW}$) und CD3⁺ ($2,8 \times 10^7/\text{kg KGW}$).

Der komplette Spenderchimärismus ab d+21 blieb bis d+168 konstant. Der mediane CsA-Talspiegel für die Immunsuppression lag über die gesamten fünf Wochen bei 575 ng/ml.

Die erste Diagnose der Erkrankung erfolgte an dem Tag d+52. Das Tier zeigte stark gerötete Augen, einen erhöhten Nasenausfluss und humpelte. Außerdem konnte Fieber (39,6 °C) nachgewiesen werden. Zusätzlich waren moderate Hautrötungen an der Bauch- und Schenkelinnenseite auszumachen. Die durchgeführten Kontrollen der Leberparameter wiesen

eine deutliche Erhöhung der Leberenzyme ALAT, ASAT und AP auf (siehe im Anhang Abbildung 25). Zum Zeitpunkt d+55 wurden ALAT- und AP-Werte, welche das 30-fache bzw. 60-fache des normalen oberen Referenzwertes überschritten, gemessen.

Sofort nach Feststellung der GvHD wurde analog zum Vorgehen beim Menschen eine Therapie mit CsA und Kortikoidsteroiden initiiert, um die überschießende Immunreaktion der Spender-T-Zellen gegen den Empfängerorganismus zu unterdrücken. Außerdem erfolgte eine antibiotische, antipyretische und analgetische Abschirmung des Tieres.

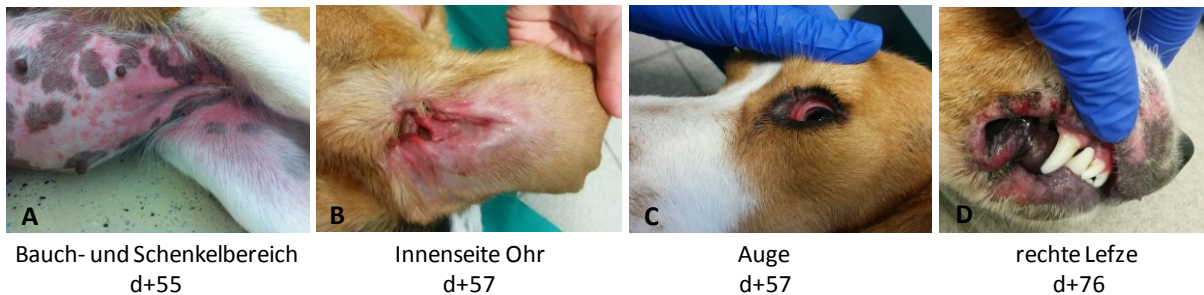


Abbildung 23: Manifestation der GvHD-Reaktion

Der Hund 5 der IV-Gruppe entwickelte an Tag d+52 eine GvHD. Die Symptome dieser Erkrankung zeigten sich unter anderem durch starke Hautrötungen am gesamten Körper (A und B) und Rötungen der Augen (C) sowie eine orale Mukositis der Maulschleimhaut (D).

Im weiteren Verlauf zeigte sich klinisch beim Tier eine intensiver ausgeprägte Haut-GvHD sowohl am gesamten Körper als auch in der Innenseite der Ohren, welche zusätzlich mit einem starken Juckreiz einherging. Darüber hinaus wurden Rötungen der Augen und eine orale Mukositis der Maulschleimhaut beobachtet (siehe Abbildung 23). Letztendlich musste das Tier aufgrund des steroid-refraktären Verlaufs der GvHD an d+168 euthanasiert werden.

5 DISKUSSION

Während der letzten 50 Jahre führte die fortwährende Forschung auf dem Gebiet der HSZT dazu, dass sie heute für eine Vielzahl von malignen hämatologischen Erkrankungen eine wichtige kurative Behandlungsmöglichkeit darstellt [45,97]. Angestrebt wird das vollständige Anwachsen der neuen HSZ, welche die Neubildung eines gesunden Blutsystems übernehmen sollen. Der Erfolg der Therapie hängt dabei von unterschiedlichen Faktoren wie der Übereinstimmung der Histokompatibilitätskomplexe des Spenders und des Empfängers, der Art der eingesetzten Immunsuppression, der Konditionierung des Empfängers sowie der Anzahl der transplantierten HSZ ab. Im Hinblick auf die HSZ-Zellzahl ist das erfolgreiche und effiziente Ansiedeln der HSZ in den HSZ-Nischen von essentieller Bedeutung, da nach konventioneller IV-Applikation weniger als 15 % der infundierten HSZ ins Empfänger-Knochenmark migrieren [44,72–74]. Mehr als 85 % der HSZ sterben auf dem Weg ins Knochenmark ab und können daher nicht zur Rekonstitution der Hämatopoese nach HSZT beitragen. Diese Problematik erfordert die Suche nach alternativen Applikationsarten, die zum einen den Zellverlust während der Migration minimieren und zum anderen ein effizienteres Homing der HSZ im Knochenmark garantieren. Dieses Potential verspricht die im Zuge dieser Arbeit angewandte IBM-Methode. Durch die Applikation der HSZ direkt in das Knochenmark wird nicht nur ein effektives Ansiedeln der HSZ in der HSZ-Nische unterstützt, sondern auch bei dosisreduzierter Konditionierung das Auftreten einer GvHD vermindert [98,99]. Diese Methode wurde bereits, jedoch vornehmlich unter myeloablativer Konditionierung in einigen präklinischen und klinischen Studien beschrieben [77,78,100-103]. Allerdings ist bislang nicht eindeutig belegt, inwieweit die Technik die hämatopoetische Rekonstitution, insbesondere die Leukozyten- und Thrombozyten-Regenerationszeit, verkürzt. Dies wäre besonders bei der Verwendung von Transplantaten mit limitierter HSZ-Zellzahl, ein erstrebenswertes Ziel.

In der vorliegenden Studie wurde am allogenen Hundetransplantationsmodell überprüft, ob die IBM-Injektion von Spender-HSZ in das Knochenmark des Empfängers nach einer 4,5 Gy TBI einen Vorteil bezüglich des Transplantatanwachsens, der hämatopoetischen Regeneration und der Toxizität gegenüber der IV-Applikation von HSZ aufzeigt.

5.1 Hämatopoetische Regeneration

Bei der allogenen HSZT muss eine hohe immunologische Hürde überwunden werden d. h. der Austausch des Immunsystems. Der Erfolg dieser Behandlung wird unter anderem durch den Zeitpunkt der hämatopoetischen Regeneration bestimmt. Diese ist nur möglich, wenn ein optimales Homing der Spender-HSZ in das Knochenmarkstroma des Empfängers erfolgt und die Spender-HSZ ihre Funktionen der Selbsterneuerung, Differenzierung und Mobilisierung ausführen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik des Transplantatanwachsens nach IV- und IBM-HSZT anhand der Regeneration von Leuko- und Thrombozytenwerten überprüft.

Zudem konnte das Einsetzen der Regeneration der Leukozytenwerte im Anschluss an die IV- und IBM-Applikation bereits ca. zehn Tage nach der HSZT beobachtet werden. Der Anstieg der Thrombozytenzahlen hingegen erfolgte erst zwei bis drei Wochen nach der HSZT und ging mit einem minimalen Transfusionsbedarf in beiden Gruppen einher. Grundsätzlich erreichten jedoch beide Zellpopulationen innerhalb von 56 Tagen wieder ihren Normwert. Diese Ergebnisse bestätigten auch die publizierten Daten zu 4,5 Gy IV-HSZT im caninen Modell von Yu et al. und Storb et al., welche einen raschen und kontinuierlichen Anstieg der Leuko- und Thrombozyten beschrieben [104,105].

Die postulierte Beschleunigung der Regenerationszeit nach der IBM-HSZT gegenüber der klassischen IV-Gabe konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zeigten Baba et al. in einer präklinischen Studie im Mausmodell, dass durch die IBM-HSZT eine effizientere hämatopoetische Regeneration im Vergleich zur IV-HSZT erfolgte. Allerdings applizierten sie eine myeloablative Konditionierung. Weiterhin postulierten Sie anhand ihrer Daten eine ebenso gesteigerte Ansiedlung der HSZ im Knochenmark durch die IBM-Methode [106]. Untermuert wurde die Effektivität durch weitere myeloablative IBM-Studien in Nagetiermodellen [76–78].

Klinische Erkenntnisse nach myeloablativer Konditionierung belegen wiederum keinen Vorteil in der hämatopoetischen Regeneration gegenüber der IV-HSZT. Hägglund et al. wiesen an 38 Patienten keine Verbesserung der Rekonstitution der Hämatopoese nach IBM- im Vergleich zur IV-HSZT nach [107]. Untermuert wurden diese Ergebnisse der klinischen Studien von Frassoni et al. und Brunstein et al. [108,109]. Darüber hinaus sahen Ramirez et al. ein großes Potential in der IBM-HSZT, welches sich allerdings bislang in der Klinik beim Vergleich beider

Applikationsmethoden unter myeloablativer Konditionierung nicht zeigte. Hinsichtlich dieses Fakttes, müssten nach Ramirez et al. deutlich größere Patientenkohorten (> 30 Personen/Gruppe) analysiert werden, um statistisch den Nutzen der IBM-Methode bezüglich der Regeneration von Neutrophilen aufzuzeigen [103]. Lediglich eine Phase I Studie von Okada et al. untersuchte an zehn Patienten unter toxisitätsreduzierter Konditionierung, bestehend aus Fludarabin (40 mg/m²), Cyclophosphamid (50 mg/kg) und einer 3 Gy TBI, die IBM-HSZT von Nabelschnurblut-Transplantaten. Allerdings konnte auch in dieser Studie kein Vorteil in der Beschleunigung der hämatopoetischen Regeneration nachweisen werden.

Dennoch schrieben sie der IBM-HSZT ein vielversprechendes Potenzial zu, die hämatopoetische Regeneration zu beschleunigen sowie das GvHD Risiko zu vermindern. Allerdings sollte dies anhand einer klinischen Studie mit größerer Patientenzahl verifiziert werden [102].

Ein weiterer wesentlicher Parameter, der die Wiederherstellung der Hämatopoese erheblich beeinflusst, stellt die Intensität der Myeloablation des Knochenmarks dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tiere mit einer 4,5 Gy TBI konditioniert, welche als mäßig myelosuppressiv einzuordnen ist [48]. Im Vergleich zu vorangegangenen nicht-myeloablativen 2 Gy Protokollen der Arbeitsgruppe um Lange et al. [80], waren die Auswirkungen der Konditionierung auf die Leuko- und Thrombozytopenie in der vorliegenden Arbeit durch deutlich niedrigere Nadire und eine längere Regenerationszeit gekennzeichnet. Dass sich mit intensiverer Konditionierung auch die Phase der Panzytopenie und der Erholung deutlich länger und intensiver ausgeprägte, beschrieben bereits Martino et al. in einer klinischen Studie an 836 Patienten [47]. Die Patienten wurden toxisitätsreduziert oder myeloablativ konditioniert und deren Regeneration der Hämatopoese beim Myelodysplastischen Syndrom untersucht. Die Studienergebnisse zeigten eine signifikant schnellere Erholung der Blutbildung nach toxisitätsreduzierter als nach myeloablativer Konditionierung. In einer weiteren Studie verglichen Sorrow et al. nicht nur den Einfluss der Myeloablation auf den Toxizitätsgrad nach HSZT, sondern auch welche Rolle bereits vorhandene Komorbiditäten des Patienten für das Überleben spielen [110]. Sie stellten fest, dass nach myeloablativer Konditionierung mit einer höhergradigen hämatologischen Toxizität zu rechnen ist als nach nicht-myeloablativer Konditionierung. Dies stellt insbesondere für Patienten mit Begleiterkrankungen einen entscheidenden Faktor dar. So bringen nicht-myeloabaltive Konditionierungsregime,

aufgrund ihrer geringeren Toxizität, für diese Patienten einen entscheidenden Vorteil mit sich. Dennoch ist die 1-Jahres-Überlebensrate ohne Rezidiv bei myeloablativer Behandlung deutlich höher als bei nicht-myeloablativer.

Darüber hinaus erhielten im Zuge der vorliegenden Arbeit je zwei Hunde pro Gruppe sogenannte „schwache“ Transplantate mit geringer CD34⁺-Zellzahl. Sowohl in der IV- als auch in der IBM-transplantierten Kohorte ähnelten die Verläufe der hämatopoetischen Regeneration denen der Tiere, die „starke“ Transplantate mit $> 2,0 \times 10^6$ CD34⁺/kg KGW bekamen. Ein Vorteil der IBM-Technik zur Applikation geringer Zellzahlen konnte nicht nachgewiesen werden. Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass bereits „schwache“ Transplantate in der Lage sind eine neue Blutbildung zu induzieren. Des Weiteren können sie nicht mit einer verlängerten Phase der Panzytopenie assoziiert werden. Diesen Ergebnissen gegenüber stehen die Erkenntnisse von Mavroudis et al., welche den Zusammenhang zwischen transplantierte CD34⁺-Anzahl und Zeitpunkt der hämatologischen Erholung untersuchten. Sie erachteten eine Mindestzellzahl von $2,0 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen/kg KGW als notwendig, um eine frühe und stabile Wiederherstellung der Hämatopoese zu gewährleisten [62]. Die Daten von Singhal et al. wiederum bestätigten hingegen, dass es keinen signifikanten Einfluss der CD34⁺-Zellzahl auf die hämatologische Regeneration von Neutrophilen und Thrombozyten gibt. Allerdings konnten sie ebenfalls belegen, dass die transplantatassoziierte Mortalität niedriger und das allgemeine Überleben nach Transplantation von $> 2,0 \times 10^6$ CD34⁺/kg KGW signifikant höher war [68].

Neben der Regeneration der Hämatopoese ist ebenso die Überprüfung der leukozytären Subpopulationen von besonderer Bedeutung. Die durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der T-Lymphozyten (CD4⁺, CD8⁺) wies sowohl nach IV- als auch nach IBM-HSZT eine starke Reduktion der Zellzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum auf, was schließlich zu einer erhöhten CD4/CD8-Ratio führte. Eine Regeneration auf das Ausgangsniveau konnte für die untersuchten T-Zellen bis zum Zeitpunkt d+112 jedoch nicht erzielt werden.

Hinsichtlich der B-Lymphozyten (CD21⁺) zeigten sich ebenfalls Verringerungen der Zellzahlen, die jedoch im Vergleich zu den T-Zellen weniger drastisch ausfielen. Die Immunrekonstitution zeigte sowohl nach IV- als auch nach IBM-HSZT keine Unterschiede auf und verlief in beiden Gruppen einheitlich. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die Rekonstitution der

Lymphozytensubpopulation auf Normalwerte nach einer HSZT bis zu einem Jahr oder länger andauern kann [111]. Die Regeneration caniner Lymphozytensubpopulationen nach 4,5 Gy TBI im Vergleich zu humanen Daten wurde bisher noch nicht beschrieben. Dennoch belegte eine Studie an immundefizienten Hunden nach erfolgter allogener HSZT eine deutlich erhöhte, außerhalb des Referenzwertes liegende, CD4/CD8-Ratio, welche sich erst innerhalb von sechs Monaten normalisierte [112]. Geddes et al. sowie Storek et al. publizierten Ergebnisse humaner Studien, welche die Immunrekonstitution nach der Transplantation von HSZ aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark verglichen. In diesen Studien konnte die Transplantation der HSZ aus dem peripheren Blut mit einer schnelleren Regeneration der Lymphozytensubpopulationen und geringeren Infektionsrate assoziiert werden [113,114]. Weitere klinische Studien belegten, dass sich CD8⁺-Zellzahlen schneller erholten als CD4⁺-Populationen [115,116]. Diese Aussagen konnten in der vorliegenden Arbeit über den Beobachtungszeitraum von 112 Tagen nicht bestätigt werden. Es zeigte sich allerdings in beiden Gruppen eine Tendenz zu einer schnelleren Erholung der CD4⁺-Werte gegenüber den Werten der CD8⁺-Zellen.

5.2 Chimärismusentwicklung

Die Untersuchung der Kinetik des Transplantatanwachsens nach allogener HSZT erfolgt durch die Analyse des hämatopoetischen Chimärismus. Anhand dieses Monitorings kann sowohl der Transplantationserfolg als auch die mögliche Transplantatabstoßung ermittelt werden, welches essenziell für den weiteren Behandlungsverlauf ist [117,118].

In der vorliegenden Arbeit konnte ein initiales und stabiles Anwachsen der Transplantate in allen Hunden beider Gruppen festgestellt werden. Mit der gewählten toxizitätsreduzierten Konditionierung von 4,5 Gy wurden sehr hohe Spenderchimärismusraten von über 90 % in den Granulozyten beider Kohorten erzielt. Die PBMC Chimärismusraten lagen gruppenübergreifend bei über 70 % Spenderanteil nach 112 Tagen. Diesbezüglich konnte insgesamt ein gemischter Spenderchimärismus nachgewiesen werden. Allerdings erreichte ein Hund einen kompletten Spenderchimärismus, welcher über den gesamten Beobachtungszeitraum beibehalten wurde. Darauf Bezug nehmend wurde in klinischer Anwendung das Erzielen eines 100 %-igen Spenderchimärismus als wünschenswerter erachtet, da der gemischte Spenderchimärismus das Risiko der Transplantatabstoßung und eines Erkrankungsrückfalls erhöhte [119]. Die postulierte beschleunigte Entwicklung des

Spenderchimärismus unter Anwendung der IBM-Technik konnte jedoch nicht belegt werden, da sowohl nach IV- als auch nach der IBM-HSZT ein sehr schnelles und optimales Anwachsen der Spender-HSZ erzielt wurde.

Diesbezüglich stellten Van Os et al. fest, dass die IBM-Methode nur zu sehr frühen Zeitpunkten wie etwa eine Stunde, 48 h bzw. sieben Tagen nach HSZT ein beschleunigtes Transplantatanwachsen gegenüber der IV-Applikation aufzeigte [120]. Gestützt wurden die Ergebnisse von Mazurier et al., die bis zu einem Zeitpunkt von fünf Wochen ein 6 - 12-fach schnelleres Transplantatanwachsen nach IBM-Applikation im Vergleich zur IV-HSZT nachwiesen [121]. Gegensätzliche Erkenntnisse wurden von Brunstein et al. 2009 veröffentlicht [109]. Sie sahen keinen Vorteil der IBM-Methode bezüglich der Kinetik des Transplantatanwachsens. Andere Studien zur Optimierung der IBM-Applikation am Hundemodell führten Kim et al 2013 durch. Sie kombinierten die IBM-HSZT mit der IV-Gabe von mesenchymalen SZ [122] und verbesserten auf diese Weise das Transplantatanwachsen im Vergleich zur IV-HSZT.

Die voneinander abweichenden Resultate der genannten Studien lassen sich vermutlich auch im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung unterschiedlicher Spezies, Konditionierungsregime und Zellzahlen im Transplantat zurückführen.

Das geltende Tierschutzgesetz hatte für das durchgeführte Versuchsvorhaben den Einsatz von „schwachen“ Transplantaten nicht zugelassen, klinisch bedingte zufällig „schwache“ Transplantate waren hingegen erlaubt. In Hinblick auf die Verwendung von Transplantaten mit geringer CD34⁺-Zellzahl in dieser Arbeit (n = 2 je Gruppe) kann gesagt werden, dass ein Spenderchimärismus auf ähnlich hohem Niveau erzielt wurde wie nach HSZT von Transplantaten mit höherer CD34⁺-Zellzahl. Der Einsatz der IBM-HSZT zur Übertragung von Nabelschnurblut-Transplantaten, die charakteristisch eher unzureichende Zellzahlen enthalten, wurde unter anderem von Frassoni et al. geprüft. In einer klinischen Phase I und II Studie erkannten sie das Potential der Technik das Auftreten des Transplantatversagens nach Nabelschnurblut-Transplantation zu umgehen [108]. Weiterführende Studien von Frassoni et al. belegten ein vorteilhaftes Transplantatanwachsen, eine frühe und stabile Regeneration der Thrombozytenwerte sowie eine niedrige Inzidenz der akuten GvHD nach erfolgter IBM-HSZT von Nabelschnurblut [123]. Dem entgegen stehen Ergebnisse von Brunstein et al., welche

einen eher mäßigen bis gar keinen Vorteil der IBM-Technik gegenüber der Applikation von Nabelschnurblut-Transplantaten aufzeigten [109].

Der Vergleich der Spenderchimärismus Daten der vorliegenden Arbeit zu vorangegangenen 2 Gy IV- und IBM-HSZT Untersuchungen dokumentiert insgesamt signifikant höhere sowie stabilere Spenderchimärismen nach erfolgter 4,5 Gy Konditionierung [80]. Somit zeigte sich mit intensiverer Ablation des Empfänger Knochenmarks ein ebenfalls stärkeres Transplantatanwachsen. Die zugrunde liegende Dosis-Wirkungsbeziehung konnten Kahl et al. im Hundemodell nach nicht-myeloablativer Konditionierung nachweisen [124]. In zusätzlichen klinischen Studien wurde ebenso beobachtet, dass der Zeitpunkt der Detektion von Spenderzellen im Empfänger von der Intensität des Konditionierungsregimes abhängig war. So wurde festgestellt, dass ein Transplantatanwachsen nach myeloablativer allogener HSZT früher einsetzt als nach nicht-myeloablativer Konditionierung [125,126]. Des Weiteren beschrieben Lapointe et al. einen Nachweis von Spendergranulozyten bereits nach 24 h und einen Spenderchimärismus von > 90 % nach fünf Tagen. Ebenso wurde durch die aggressivere Konditionierung frühzeitig ein kompletter Spenderchimärismus entwickelt. Wohingegen nicht-myeloablative Regime, anfangs einen gemischten Spenderchimärismus hervorbrachten und erst im weiteren Verlauf zu einem vollständigen Spenderchimärismus führten [125,127].

5.3 Toxizitäten und Komplikationen in der Posttransplantationsphase

Die allogene HSZT ist mit erheblichen Risiken und Nebenwirkungen assoziiert, wie dem Auftreten von Infektionen oder einer GvHD. Damit derartige Komplikationen minimiert werden können, ist die ständige Optimierung der Therapieoptionen von großer Wichtigkeit.

Die grundlegende präklinische Forschung zur Toxizitätsreduktion der HSZT wurden am Hundemodell durch Storb et al. in den 80er und 90er Jahren vorangetrieben [83,104,128,129]. Deren Ergebnisse zeigten, dass ein stabiles Transplantatanwachsen mit der Reduktion der TBI bei gleichzeitiger Intensivierung der Immunsuppression beibehalten werden konnte und außerdem zu einer Verminderung toxischer Begleiterscheinungen führte [83].

In der vorliegenden Arbeit stand daher neben dem Transplantationserfolg ebenso die Überprüfung der Verträglichkeit des gewählten toxizitätsreduzierten Regimes nach erfolgter IV- und IBM-HSZT im Fokus. Diesbezüglich wurde der klinische Verlauf der Tiere über die gesamte Posttransplantationsphase untersucht.

Während der Phase der Immunsuppression konnten geringfügige Veränderungen der untersuchten Parameter beobachtet werden. Vergleichend untereinander ergaben sich in beiden Gruppen jedoch keine signifikanten Differenzen. In der Phase der Leukozytopenie zeigte lediglich Hund 7 der IBM-Kohorte Anzeichen fehlender hämatopoetischer Erholung und verstarb aufgrund einer bakteriellen Infektion frühzeitig an d+15 nach erfolgter HSZT. Insgesamt konnte trotz Thrombozytopenie keine erhöhte Blutungsneigung oder ein vermehrter Bluttransfusionsbedarf der Tiere festgestellt werden. Allerdings entwickelte in der IV-Gruppe Hund 5 eine GvHD und Hund 6 eine transplantationsassoziierte Immunhämolyse (H6). Beide Tiere mussten letztendlich euthanasiert werden.

Grundsätzlich besteht für den Patienten nach jeder HSZT das Risiko eine Infektion zu erleiden und im schlimmsten Fall daran zu versterben. Die Infektanfälligkeit ist in der Phase der Leukozytopenie aufgrund des Fehlens einer schützenden immunologischen Barriere am größten. Gil et al. analysierten Risikofaktoren, die nach einer Hochdosistherapie und autologer HSZT auftraten. Ihren Ergebnissen zufolge gibt es eine direkte Verbindung zwischen dem Konditionierungsregime, der auftretenden Neutropeniedauer und der daraus resultierenden erhöhten Infektionsrate. Das höchste Risiko bestand für Patienten mit akuter Leukämie und denen nach myeloablativer TBI aufgrund der länger anhaltenden Neutropenie [130]. Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hunde keine Grunderkrankung hatten, konnte diese Wechselbeziehung ebenfalls beobachtet werden. Ein Risiko einer Infektion kann allerdings auch nach der erfolgreichen Regeneration der Blutbildung durch das verspätete Einsetzen der T- und B-Zell Rekonstitution bestehen [51]. Laut Atkinson et al. führte bei 87 % aller allogenen transplantierten Patienten die langsamere Erholung der Lymphozytensubpopulationen selbst nach erfolgreichem Transplantatanwachsen zu wenigstens einer Infektion und bei 48 % sogar zu mindestens drei Infektionen [111]

Eine der Hauptnebenwirkungen nach HSZT stellt die GvHD dar [131,132]. In der vorliegenden Arbeit traten bei einem Hund typische Symptome dieses Erkrankungsbildes, wie Augen- und Hautrötungen sowie eine deutliche Erhöhung spezifischer Leberwerte, auf. Vergleichbare klinische Symptome konnten bereits ebenfalls in humanen Situationen beobachtet werden [133]. Zudem stieg der Spenderchimärismus im peripheren Blut und dem Knochenmark des erkrankten Hundes auf 100 % und stagnierte auf diesem Niveau bis zum Tod des Tieres. Um der GvHD entgegenzuwirken, erfolgte eine Behandlung mit Glukokortikoiden und CsA, wie sie

ebenfalls adäquat zum Menschen durchgeführt wird [134]. Trotz dieser akut durchgeführten Maßnahmen entwickelte der Hund eine steroid-refraktäre GvHD und musste schlussendlich euthanasiert werden. Dieses nicht Ansprechen auf die Behandlung konnten bereits Westin et al. in einer klinischen Studie aufzeigen, welche eine Mortalitätsrate von über 90 % bei der steroid-refraktären GvHD belegte [135].

Zusammenfassend repräsentierten die aufgetretenen Todesfälle klassische und bekannte Komplikationen nach allogener HSZT [51,54,136,137], wobei es in der vorliegenden Arbeit zu keiner spezifischen Häufung einer dieser Todesursachen kam.

Bezüglich der therapieassoziierten Toxizität zeigten sich nach 4,5 Gy TBI Krankheitsbilder wie die GvHD und die Immunhämolyse. Diese traten in den bisher durchgeführten 70 nicht-myeloablativen HSZT am caninen Modell der Arbeitsgruppe nicht auf [80,85,87-90,138]. Schlussfolgernd scheint in der vorliegenden Arbeit der Grad der Toxizität eher von der Konditionierung als von der Applikationsart bestimmt worden zu sein.

5.4 Machbarkeit und Sicherheit der IBM-HSZT

Als wichtigstes und innovatives Ergebnis konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine IBM-HSZT im allogenen HSZT-Modell nach 4,5 Gy TBI möglich ist.

Für die allogene IBM-HSZT wurde das Transplantat zur Volumenreduktion aufgearbeitet und als Buffy-Coat Suspension (2x 25 ml) direkt in den *Humerus* und *Femur* simultan über einen Perfusor über einen Zeitraum von 10 min appliziert. In der Kontrollgruppe wurde das unmodifizierte Knochenmark nach dem klassischen IV-Verfahren verabreicht. In beiden Gruppen vertrugen alle Tiere die Narkose gut und die Punktion des Knochens für die IBM-Applikation erfolgte problemlos.

Ebenso konnten die definierten Knochenmarkvolumina in der vorgegebenen Zeitspanne appliziert sowie anschließend keine Infektionen an der Punktionsstelle des Empfängers beobachtet werden.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte sowohl vor als auch nach der Aufbereitung der Transplantate keine Veränderungen der Transplantatzusammensetzung, sodass eine Volumenreduktion durch die Buffy-Coat Zentrifugation ohne signifikanten Zellverlust für die IBM-HSZT durchgeführt werden konnte. Bereits frühere Untersuchungen von Lange et al. bestätigten, dass die Buffy-Coat Zentrifugation als geeignete Methode zur

Transplantataufbereitung für die IBM-HSZT fungieren kann [80]. Die Technik der IBM-Applikation an Hunden hingegen, wurde bislang nur in der Arbeitsgruppe um Junghans et al. an der Rostocker Universitätsmedizin getestet. Andere Untersuchungen wurden fast ausschließlich mit myeloablativen Konditionierungsverfahren (7,5-11 Gy) oder aber an Kleintiermodellen durchgeführt. So wurde die Machbarkeit der IBM Applikation und deren Effizienz gegenüber der IV-Übertragung in verschiedenen Nagetiermodellen aufgezeigt [78,79,139–143]. Für das Großtiermodell hingegen existieren lediglich eine methodische Studie an Rhesusaffen sowie an Schweinen, die jedoch die Machbarkeit und Sicherheit der IBM-HSZT für Großtiere überprüfen und belegen konnten [144,145].

Ziel aller präklinischen Untersuchungen ist es Ergebnisse zu erzielen die eine Übertragung in die klinische Anwendung ermöglichen. Hinsichtlich dieses Hintergrundes wurde die IBM-Methode bereits am Menschen durchgeführt [102,103,107,108], wobei in diesen klinischen Studien myeloablativ Konditionierungsregime eingesetzt wurden. Diese intensive Konditionierung ist im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten toxizitätsreduzierten 4,5 Gy TBI, jedoch deutlich toxischer für den Patienten. Alles in allem konnten die gewonnenen Ergebnisse der humanen Studien die Aussagen der hier vorliegenden Arbeit zur Machbarkeit und Sicherheit stützen.

Aussagen über optimale Infusionsmengen und Flussgeschwindigkeit für die IBM-HSZT unterscheiden sich allerdings bisher noch stark. Am Schwein wurden unterschiedliche Volumina von 5-10 ml mit verschiedenen Infusionsraten (0,1-2,5 ml/s) getestet und anschließend deren Einfluss auf den Verbleib der HSZ im Knochenmark untersucht. Pantin et al. stellten fest, dass beim Überschreiten des Volumens von 10 ml und einer Infusionsgeschwindigkeit von mehr als 0,2 ml/s die Zellen schlechter im Knochenmark zurückgehalten werden als bei der Verwendung geringerer Volumina und Flussraten, wodurch schlussendlich kein optimales Homing zustande kommt [145]. Die Prozedur der IBM-HSZT am Affenmodell wurde hingegen mit einer Menge von 1 ml Knochenmark durchgeführt und die Zellen wurden erfolgreich in den *Humerus* oder die *Tibia* mit einer Flussrate von 30 μ l/s infundiert. Dementsprechend stellten Inaba et al. in ihrer Studie mit diesen gewählten Bedingungen keinen Nachteil fest [144]. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Infusionsrate von 25 ml in 10 min ($\hat{=}$ 42 μ l/s) schien folglich angemessen gewählt, obwohl das infundierte Gesamtvolumen mehr als 10 ml betrug. Dem gegenübergestellt fanden Massollo

et al. heraus, dass schon nach wenigen Sekunden die applizierten Spenderzellen auf die Knochenmarkumgebung geprägt werden und es deshalb nicht ausschlaggebend ist, mit welcher Geschwindigkeit die Zellen injiziert werden [139].

Wichtiger scheint dem entsprechend bei der Durchführung der IBM-HSZT der Aspekt der verwendeten Zellzahl bzw. Zelldichte zu sein. So zeigte sich beim Vergleich der einzelnen Studien, dass unterschiedliche Zellzahlen von $3,3 \times 10^4$ - $3,0 \times 10^6$ Zellen/ μ l zur IBM-Applikation verwendet wurden [78,141,143,144,146]. In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten IBM median $61,1 \times 10^8$ TNC ($\triangleq 2,4 \times 10^5$ Zellen/ μ l), welche mittig der genannten Spannweite liegen, problemlos infundiert werden. Demzufolge belegen diese Experimente, dass sich mit der IBM-Technik sowohl eine geringe als auch eine hohe Zelldichte applizieren lässt, welche sowohl in Klein- und auch Großtieren anwendbar ist.

Der mögliche Nutzen der IBM-Technik hat im humanen Bereich besonders bezüglich der Verwendung von Nabelschnurblut-Transplantaten potentielle Bedeutung. Diese „schwachen“ Transplantate sind aufgrund der unzureichenden HSZ-Zellzahl in der klinischen Anwendung eher problematisch [69]. Dem gegenüber konnten Marini et al. das vielversprechende Potential der IBM-Injektion von HSZ aus dem Nabelschnurblut durch ein nuklearmedizinisches Bildgebungs-verfahren, der Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie (PET-CT), deklarieren. Sie vermuteten eine bessere Aufnahme der Zellen in den Knochenmarkraum unter Anwendung der IBM-Methode und zeigten durch die Visualisierung der Zellmigration den möglichen Vorteil bezüglich der HSZ-Ansiedelung gegenüber der konventionellen IV- Methode [147].

Insgesamt bewiesen alle Forschungsarbeiten zur IBM-HSZT, dass es sich hierbei um eine vielversprechende Alternative zur IV-Applikation handelt, die ein erhöhtes Maß an Sicherheit und Verträglichkeit in der Anwendung bietet.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die allogene HSZT ist für viele maligne hämatologische Erkrankungen die einzige kurative Therapie. Allerdings kann der Behandlungserfolg durch Komplikationen wie Transplantatabstoßung oder das Auftreten eines Rezidivs nachhaltig geschmälert werden. Einen wesentlichen Risikofaktor für ein effektives, langanhaltendes Transplantatanwachsen stellt die applizierte HSZ-Anzahl dar. Die konventionelle IV-Übertragung der HSZ ist mit einem sehr hohen HSZ-Verlust assoziiert. Im Gegensatz dazu könnte die direkte IBM-Applikation eine potentielle Methode darstellen, die die Verlustrate der HSZ minimiert und auf diese Weise ein effizienteres Transplantatanwachsen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher vergleichende Untersuchungen zur IV- und IBM-Applikation von HSZ in einem allogenen caninen HSZT-Modell durchgeführt. Hierfür wurde die allogene HSZT an DLA-identischen Geschwisterhunden unter toxizitätsreduzierter Konditionierung mit 4,5 Gy TBI und einer Immunsuppression mit CsA untersucht.

Insgesamt konnte die Machbarkeit der IBM-Applikation der HSZ unter toxizitätsreduzierter Konditionierung im allogenen Hundemodell demonstriert werden. Die gleichmäßige Infusion von jeweils 25 ml Buffy-Coat innerhalb von 10 min in den *Humerus* und *Femur* stellt hierbei das Mittel der Wahl dar und wurde durch den Einsatz von Perfusoren ermöglicht. Die Technik der IBM-Injektion wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert und als sicher und durchführbar eingestuft. Ein Unterschied in der Kinetik der Regeneration der Hämatopoese nach der IBM-Applikation konnte im Vergleich zur IV-Gabe allerdings nicht nachgewiesen werden. In Hinblick auf die leukozytären Subpopulationen zeigten beide Gruppen sowohl einen einheitlichen als auch ähnlichen Verlauf nach erfolgter HSZT, wobei über den gesamten Beobachtungszeitraum vorwiegend keine Erholung der Zellpopulation auf den Normwert nachgewiesen werden konnte. Dessen ungeachtet wurde in beiden Gruppen ein rasches über den festgelegten Versuchszeitraum, stabiles Transplantatanwachsen beobachtet. Im Vergleich zu vorangegangenen nicht-myeloablativen Studien der Arbeitsgruppe, konnte ein deutlicher Unterschied nachgewiesen werden, der sich durch signifikant höhere Spenderchimärismen nach 4,5 Gy TBI auszeichnete.

Darüber hinaus traten im Verlauf der Untersuchungen drei Todesfälle auf, welche durch klassische Komplikationen einer HSZT bedingt waren und sich unabhängig von der Applikationsart entwickelten.

Zusammenfassend zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass die IBM-HSZT unter toxizitätsreduzierter Konditionierung zum einen möglich ist und zum anderen äquivalente Transplantationserfolge im Vergleich zur klassischen IV-Methode erzielt werden können.

Um ergänzende Aussagen über das klinische Potenzial dieser Strategie treffen zu können, sollten weiterführende Untersuchungen über die Verwendung von Transplantaten mit geringer Zellzahl in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden in wie weit die Verlängerung der HSZ-Infusionszeit in das Knochenmark zu einer Beschleunigung der hämatopoetischen Regeneration führt.

Die Applikation der HSZ direkt in das Knochenmark stellt zusammenfassend ein Vorgehen dar, welches unbedingt weiter präklinisch und klinisch evaluiert werden sollte.

7 LITERATUR

- [1] Mahlberg R, Gilles A, Läsch A. Hämatologie: Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. Wiley; 2014.
- [2] Hoffbrand A, Pettit J, Moss P, Hoelzer D. Grundkurs Hämatologie. Georg Thieme Verlag; 2003.
- [3] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58–62.
- [4] Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 2011;195:709–20.
- [5] Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol* 2005;26:426–33.
- [6] Haas R, Kronenwett R. Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle: Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen ; mit 2 Tabellen. Deutscher Ärzteverlag; 2005.
- [7] Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007.
- [8] Hehn S. Blut und Blutbildung 2014.
- [9] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells. *J Immunol* 1984;133:157–65.
- [10] Martinez-Agosto JA, Mikkola HKA, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 2007;21:3044–60.
- [11] Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C. Pathogenese und Biologie der Leukämien. *Internist (Berl)* 2002;43:1179–89.
- [12] Hołowicki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewnętrznej* 2008;118:658–63.
- [13] Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605–31.
- [14] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841–6.
- [15] Hoffman CM, Calvi LM. Minireview: complexity of hematopoietic stem cell regulation in the bone marrow microenvironment. *Mol Endocrinol* 2014;28:1592–601.
- [16] Kfoury Y, Mercier F, Scadden DT. SnapShot: The Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell* 2014;158:228–228.e1.
- [17] Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006;31:589–95.
- [18] Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 2015;125:2621–9.
- [19] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7–25.

- [20] Alvarez P, Carrillo E, Vélez C, Hita-Contreras F, Martínez-Amat A, Rodríguez-Serrano F, et al. Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *Biomed Res Int* 2013;2013:312656.
- [21] Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M. Perspective: Fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: A journey to niches and beyond. *Exp Hematol* 2005;33:9–19.
- [22] Voog J, Jones DL. Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell* 2010;6:103–15.
- [23] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006.
- [24] Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 2006;7:333–7.
- [25] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93–106.
- [26] Weber JM, Calvi LM. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone* 2010;46:281–5.
- [27] Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grünewald E, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 2005;201:1781–91.
- [28] Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2007;1:671–84.
- [29] Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 2007;1:685–97.
- [30] Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901–10.
- [31] Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 2006;25:977–88.
- [32] Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005;121:1109–21.
- [33] Yoon K-A, Cho H-S, Shin H-I, Cho J-Y. Differential regulation of CXCL5 by FGF2 in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells Dev* 2012;21:3391–402.
- [34] Kopp H-G, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:349–56.
- [35] Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84:7–20.
- [36] Garrett RW, Emerson SG. Bone and Blood Vessels: The Hard and the Soft of Hematopoietic Stem Cell Niches. *Cell Stem Cell* 2009;4:503–6.
- [37] Xie Y, Yin T, Wiegand W, He XC, Miller D, Stark D, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 2009;457:97–101.

- [38] Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 2009;457:92–6.
- [39] Slayton WB, Li X-M, Butler J, Guthrie SM, Jorgensen ML, Wingard JR, et al. The role of the donor in the repair of the marrow vascular niche following hematopoietic stem cell transplant. *Stem Cells* 2007;25:2945–55.
- [40] Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med* 2006;57:403–17.
- [41] Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2265–75.
- [42] Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2276–85.
- [43] Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood* 2004;104:3813–20.
- [44] Cui J, Wahl RL, Shen T, Fisher SJ, Recker E, Ginsburg D, et al. Bone marrow cell trafficking following intravenous administration. *Br J Haematol* 1999;107:895–902.
- [45] Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015;476–82.
- [46] Ram R, Storb R, Sandmaier BM, Maloney DG, Woolfrey A, Flowers MED, et al. Non-myeloablative conditioning with allogeneic hematopoietic cell transplantation for the treatment of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2011;96:1113–20.
- [47] Martino R, Iacobelli S, Brand R, Jansen T, van Biezen A, Finke J, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108:836–46.
- [48] Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giral S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1628–33.
- [49] Graves SS, Storer BE, Butts TM, Storb R. Comparing high and low total body irradiation dose rates for minimum-intensity conditioning of dogs for dog leukocyte antigen-identical bone marrow grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013.
- [50] Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie: Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. UNI-MED-Verlag; 2004.
- [51] Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb H-J, et al. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies—guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003;82 Suppl 2:S175–85.

- [52] Vigorito AC, Campregher P V., Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem HP, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* 2009.
- [53] Zhao X, Xu L, Liu D, Han T, Wang Y, Zhang X, et al. [A comparison of clinical characteristics and prognosis of adult acute graft-versus-host disease between human leukocyte antigen- identical and -mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2014;53:35–9.
- [54] Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:35.
- [55] Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068–73.
- [56] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555–62.
- [57] Mavroudis D, Barrett J. The graft-versus-leukemia effect. *Curr Opin Hematol* 1996;3:423–9.
- [58] Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie*. Hüthig Jehle Rehm; 2013.
- [59] Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: Does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 2001;98:2900–8.
- [60] Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:1161–7.
- [61] Sirinoglu Demiriz I, Tekgunduz E, Altuntas F. What Is the Most Appropriate Source for Hematopoietic Stem Cell Transplantation? Peripheral Stem Cell/Bone Marrow/Cord Blood. *Bone Marrow Res* 2012;2012:1–5.
- [62] Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996;88:3223–9.
- [63] Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491–6.
- [64] Brunstein CG, Weisdorf DJ. Future of cord blood for oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009.
- [65] Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611–8.
- [66] Smith AR, Wagner JE. Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: Place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2009;147:246–61.
- [67] Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:893–908.

- [68] Singhal S, Powles R, Treleaven J, Kulkarni S, Sirohi B, Horton C, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2×10^6 CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant* 2000;26:489–96.
- [69] Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 2013;122:491–8.
- [70] Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: Relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010.
- [71] Delaney C, Ratajczak MZ, Laughlin MJ. Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution. *Expert Rev Hematol* 2011;3:273–83.
- [72] van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood* 1999.
- [73] van der Loo JC, Ploemacher RE. Marrow- and spleen-seeding efficiencies of all murine hematopoietic stem cell subsets are decreased by preincubation with hematopoietic growth factors. *Blood* 1995;85:2598–606.
- [74] Cashman JD, Eaves CJ. High marrow seeding efficiency of human lymphomyeloid repopulating cells in irradiated NOD/SCID mice. *Blood* 2000;96:3979–81.
- [75] Zhang Y, Yasumizu R, Sugiura K, Hashimoto F, Amoh Y, Lian Z, et al. Fate of allogeneic or syngeneic cells in intravenous or portal vein injection: possible explanation for the mechanism of tolerance induction by portal vein injection. *Eur J Immunol* 1994;24:1558–65.
- [76] Shi M, Adachi Y, Shigematsu A, Koike-Kiriyama N, Feng W, Yanai S, et al. Intra-Bone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells Suspended in Collagen Gel Retains Injected Cells in Bone Marrow, Resulting in Rapid Hemopoietic Recovery in Mice. *Stem Cells* 2008;26:2211–6.
- [77] Nakamura K, Inaba M, Sugiura K, Yoshimura T, Kwon A-H, Kamiyama Y, et al. Enhancement of allogeneic hematopoietic stem cell engraftment and prevention of GVHD by intra-bone marrow bone marrow transplantation plus donor lymphocyte infusion. *Stem Cells* 2004.
- [78] Castello S, Podestà M, Menditto VG, Ibatì A, Pitto A, Figari O, et al. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: An alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol* 2004;32:782–7.
- [79] Klimczak A, Unal S, Jankowska A, Coburn C, Siemionow M. Donor-origin cell engraftment after intraosseous or intravenous bone marrow transplantation in a rat model. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:373–80.
- [80] Lange S, Steder A, Killian D, Knuebel G, Sekora A, Vogel H, et al. Engraftment efficiency after intra-bone marrow versus intravenous transplantation of bone marrow cells in a canine nonmyeloablative DLA-identical transplantation model. Submitted 2016.

- [81] Lupu M, Storb R. Five decades of progress in haematopoietic cell transplantation based on the preclinical canine model. *Vet Comp Oncol Author Manuscript* 2007;5:14–30.
- [82] Storb R, Epstein RB, Thomas ED. Marrow repopulating ability of peripheral blood cells compared to thoracic duct cells. *Blood* 1968;32:662–7.
- [83] Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997;89:3048–54.
- [84] Ladiges WC, Storb R, Thomas ED. Canine models of bone marrow transplantation. *Lab Anim Sci* 1990;40:11–5.
- [85] Junghanss C, Rathsack S, Wacke R, Weirich V, Vogel H, Drewelow B, et al. Everolimus in combination with cyclosporin a as pre- and posttransplantation immunosuppressive therapy in nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1061–8.
- [86] Hilgendorf I, Weirich V, Zeng L, Koppitz E, Wegener R, Freund M, et al. Canine haematopoietic chimerism analyses by semiquantitative fluorescence detection of variable number of tandem repeat polymorphism. *Vet Res Commun* 2005;29:103–10.
- [87] Knueppel A, Lange S, Altmann S, Sekora A, Knuebel G, Vogel H, et al. Upfront denileukin diftitox as in vivo regulatory T-cell depletion in order to enhance vaccination effects in a canine allogeneic hematopoietic stem cell transplantation model. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;145:233–40.
- [88] Machka C, Lange S, Werner J, Wacke R, Killian D, Knueppel A, et al. Everolimus in combination with mycophenolate mofetil as pre- and post-transplantation immunosuppression after nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in canine littermates. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1301–6.
- [89] Lange S, Mueller SC, Altmann S, Dahlhaus M, Drewelow B, Freund M, et al. Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in combination with CsA in dogs after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:667–74.
- [90] Killian D, Reichard M, Knueppel A, Lange S, Sekora A, Knuebel G, et al. Distribution changes of epithelial dendritic cells in canine cornea and mucous membranes related to hematopoietic stem cell transplantation. *In Vivo* 2013;27:761–71.
- [91] Sargan DR. IDID: Inherited Diseases in Dogs: Web-based information for canine inherited disease genetics. *Mamm Genome* 2004;15:503–6.
- [92] Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005;438:803–19.
- [93] McSweeney P a, Niederwieser D, Shizuru J a, Sandmaier BM, Molina a J, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus- tumor effects. *Blood* 2001;97:3390–400.
- [94] Weiden PL, Storb R, Tsoi MS, Graham TC, Lerner KG, Thomas ED. Infusion of donor lymphocytes into stable canine radiation chimeras: implications for mechanism of

- transplantation tolerance. *J Immunol* 1976;116:1212–9.
- [95] Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462–5.
- [96] Schaefer S, Werner J, Lange S, Machka C, Knuebel G, Sekora A, et al. Graft-versus-Host-Disease in a dog after reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation from a DLA-identical littermate: a case study n.d.
- [97] Baron F, Storb R, Little MT. Hematopoietic cell transplantation: Five decades of progress. *Arch Med Res* 2003.
- [98] Miyake T, Inaba M, Fukui J, Ueda Y, Hosaka N, Kamiyama Y, et al. Prevention of graft-versus-host disease by intrabone marrow injection of donor T cells: Involvement of bone marrow stromal cells. *Clin Exp Immunol* 2008.
- [99] Esumi T, Inaba M, Ichioka N, Kushida T, Iida H, Ikehara S. Successful allogeneic leg transplantation in rats in conjunction with intra-bone marrow injection of donor bone marrow cells. *Transplantation* 2003.
- [100] Cui J, Wahl RL, Shen T, Fisher SJ, Recker E, Ginsburg D, et al. Bone marrow cell trafficking following intravenous administration. *Br J Haematol* 1999;107:895–902.
- [101] Ikehara S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: A new strategy for treatment of stem cell disorders. *nAnn. N. Y. Acad. Sci.*, 2005.
- [102] Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, et al. Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: A Phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012.
- [103] Ramirez PA, Wagner JE, Brunstein CG. Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* 2010.
- [104] Yu C, Storb R, Mathey B, Deeg HJ, Schuening FG, Graham TC, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment. *Blood* 1995;86:4376–81.
- [105] Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Schuening FW, Sandmaier BM, Graham TC, et al. What radiation dose for DLA-identical canine marrow grafts? *Blood* 1988;72:1300–4.
- [106] Baba S, Inaba M, Iwai H, Taira M, Takada K, Hisha H, et al. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation facilitates hemopoietic recovery including dendritic cells. *Immunobiology* 2005;210:33–42.
- [107] Hägglund H, Ringdén O, Agren B, Wennberg L, Remberger M, Rundquist L, et al. Intraosseous compared to intravenous infusion of allogeneic bone marrow. vol. 21. 1998.
- [108] Frassoni F, Gualandi F, Podestà M, Raiola AM, Ibatì A, Piaggio G, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008.
- [109] Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, Defor TE, McKenna D, Chong SY, et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. 2009.

- [110] Sorrow ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 2004;104:961–8.
- [111] Atkinson K, Farewell V, Storb R, Tsoi MS, Sullivan KM, Witherspoon RP, et al. Analysis of late infections after human bone marrow transplantation: role of genotypic nonidentity between marrow donor and recipient and of nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1982;60:714–20.
- [112] Vernau W, Hartnett BJ, Kennedy DR, Moore PF, Henthorn PS, Weinberg KI, et al. T cell repertoire development in XSCID dogs following nonconditioned allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* 2007;13:1005–15.
- [113] Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. 2001.
- [114] Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:329–48.
- [115] Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, et al. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001.
- [116] de Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune-reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015.
- [117] Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Löffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 1993;7:679–87.
- [118] Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001;15:293–302.
- [119] de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C, et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:865–72.
- [120] van Os R, Ausema A, Dontje B, van Riezen M, van Dam G, de Haan G. Engraftment of syngeneic bone marrow is not more efficient after intrafemoral transplantation than after traditional intravenous administration. *Exp Hematol* 2010;38:1115–23.
- [121] Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003;9:959–63.
- [122] Kim DS, Lee MW, Noh YH, Jang MC, Lee SH, Son MH, et al. Engraftment Efficacy of Human Hematopoietic Stem Cells Transplanted into NOD/SCID Mice Using Two Methods: Intra-Bone Marrow Transplantation of Hematopoietic Stem Cells and Intravenous Co-Transplantation with Mesenchymal Stem Cells. *Acta Haematol* 2013;131:179–82.

- [123] Frassoni F, Varaldo R, Gualandi F, Bacigalupo A, Sambuceti G, Sacchi N, et al. The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010.
- [124] Kahl C, Mielcarek M, Iwata M, Harkey MA, Storer B, Torok-storb B. Radiation Dose Determines the Degree of Myeloid Engraftment after Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation 2004;833:826–33.
- [125] Lapointe C, Forest L, Lussier P, Busque L, Lagace F, Perreault C, et al. Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Bone Marrow Transpl* 1996;17:1143–8.
- [126] Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res* 1995;19:497–504.
- [127] Gleissner B, Blau IW, Sindram a, Reinhardt R, Knauf W, Thiel E. Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2001;23:401–6.
- [128] Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Deeg HJ, Graham TC, Schuening FG, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: the effect of canine recombinant hematopoietic growth factors. *Blood* 1994;84:3558–66.
- [129] Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Graham TC, Schuening FG, Sale G, et al. Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts. *Blood* 1989;74:1139–43.
- [130] Gil L, Styczynski J, Komarnicki M. Infectious complication in 314 patients after high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation: risk factors analysis and outcome. *Infection* 2007;35:421–7.
- [131] Jaksch M, Mattsson J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 2005.
- [132] Sung AD, Chao NJ. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. *Stem Cells Transl Med* 2013.
- [133] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550–61.
- [134] Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007;109:4119–26.
- [135] Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol* 2011;2011:601953.
- [136] Shiksha Kedia, Pranab Sharma Acharya, Farhan Mohammad, Huy Nguyen, Deepak Asti, Suchita Mehta MP and N, Mobarakai. Infectious Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - infectious-complications-of-hematopoietic-stem-cell-transplantation-2157-7633.S3-002.pdf. *J Stem Cell Res* 2013.
- [137] Rovira J, Cid J, Gutiérrez-García G, Pereira A, Fernández-Avilés F, Rosiñol L, et al. Fatal immune hemolytic anemia following allogeneic stem cell transplantation: Report of 2 cases and review of literature. *Transfus Med Rev* 2013;27:166–70.

- [138] Lange S, Altmann S, Brandt B, Adam C, Riebau F, Vogel H, et al. Investigation of immunological approaches to enhance engraftment in a 1 Gy TBI canine hematopoietic stem cell transplantation model. *Exp Hematol* 2009;37:143–50.
- [139] Massollo M, Podestà M, Marini C, Morbelli S, Cassanelli C, Pinto V, et al. Contact with the bone marrow microenvironment readdresses the fate of transplanted hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2010.
- [140] Okazaki S, Hisha H, Mizokami T, Takaki T, Wang X, Song C, et al. Successful acceptance of adult liver allografts by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells Dev* 2008.
- [141] Li Q, Hisha H, Yasumizu R, Fan T-X, Yang G-X, Li Q, et al. Analyses of very early hemopoietic regeneration after bone marrow transplantation: comparison of intravenous and intrabone marrow routes. *Stem Cells* 2007.
- [142] Fukui J, Inaba M, Ueda Y, Miyake T, Hosaka N, Kwon A-H, et al. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007;25:1595–601.
- [143] Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, et al. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: A powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 2001.
- [144] Inaba M, Adachi Y, Hisha H, Hosaka N, Maki M, Ueda Y, et al. Extensive studies on perfusion method plus intra-bone marrow-bone marrow transplantation using cynomolgus monkeys. *Stem Cells* 2007.
- [145] Pantin JM, Hoyt RF, Aras O, Sato N, Chen MY, Hunt T, et al. Optimization of intrabone delivery of hematopoietic progenitor cells in a swine model using cell radiolabeling with [89]zirconium. *Am J Transplant* 2015;15:606–17.
- [146] Mukaide H, Adachi Y, Koike-Kiriyama N, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, et al. Immunotherapy for malignant tumors using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells. *Int J Oncol* 2007;30:1309–15.
- [147] Marini C, Podestà M, Massollo M, Capitanio S, Fiz F, Morbelli S, et al. Intrabone transplant of cord blood stem cells establishes a local engraftment store: A functional PET/FDG study. *J Biomed Biotechnol* 2012.

8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

ARTIKEL

Schaefer S, **Werner J**, Lange S, Machka C, Knuebel G, Sekora A, Roolf C, Winkler T, Murua Escobar H, Nolte I, Junghanss C.

Graft-versus-Host-Disease in a dog after reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation from a DLA-identical littermate: a case study (eingereicht)

Lange S, Steder A, Glass Ä, Killian D, Wittmann S, Machka C, **Werner J**, Schäfer S, Roolf C, Junghanss C.

Low radiation dose and low cell dose increase the risk of graft rejection in a canine hematopoietic stem cell transplantation model. Biol Blood Marrow Transplant. 2016 Jan 20. pii: S1083-8791(16)00087-2.

Machka C, Lange S, **Werner J**, Wacke R, Killian D, Knueppel A, Knuebel G, Vogel H, Lindner I, Roolf C, Murua Escobar H, Junghanss C.

Everolimus in combination with mycophenolate mofetil as pre- and post-transplantation immunosuppression after nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in canine littermates. Biol Blood Marrow Transplant. 2014 Sep;20(9):1301-6.

TEILNAHME AN NATIONALEN UND INTERNATIONALEN FACHTAGUNGEN

POSTERBEITRÄGE

Werner J, Schaefer S, Lange S, Murua Escobar H, Machka C, Knuebel G, Sekora A, Vogel H, Lindner I, Junghanss C.

Intra-bone marrow transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells following reduced intensity conditioning in DLA-identical canine littermates. Oncol Res Treat 2014;37(suppl 5):1–313. S 136

Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie in Hamburg 10. - 14. Oktober 2014.

Werner J, Schaefer S, Lange S, Machka C, Knuebel G, Sekora A, Roolf C, Murua Escobar H, Vogel H, Lindner I, Freund M, Junghanss C.

Engraftment Effects of Intra Bone Marrow Compared to Intravenous Transplantation of Allogeneic Hematopoietic Stem Cells Following a Reduced Intensity Conditioning in a DLA-Identical Canine Littermate Model. Blood 2014 Vol.124, Issue 21.1089

Jahrestagung der American Society of Hematology (ASH) in San Francisco 05. - 10. Dezember 2014

WEITERE ABTRACTS

Lange S, Knueppel A, Killian D, Machka C, **Werner J**, Schäfer S, Glass Ä, Roolf C, Murua Escobar H, Junghanss C.

Radiation dose and cell dose determine graft survival in a canine hematopoietic stem cell transplantation model. Bone Marrow Transplantation 2015;50 (Suppl. 1). S473

Werner J, Schaefer S, Lange S, Machka C, Knuebel G, Sekora A, Vogel H, Lindner I, Murua Escobar H, Nolte I, Junghanss C

Comparative evaluation of intra-bone marrow and intra-venous bone marrow transplantation in DLA-identical canine littermates. 2014 Proceedings of the Veterinary Cancer Society: S.57

Jahrestagung der Veterinary Cancer Society (VCS) in St. Louis 09. - 11. Oktober 2014

VORTRÄGE

Gastvortrag an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Thema „Präklinische Untersuchungen zur nicht-myeloablativen Stammzelltransplantation“

Doktorandenkolloquium in Hannover am 28.04.2015

9 DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Junghanß für die Möglichkeit bedanken, direkt im Anschluss an meine Diplomarbeit die Forschung am Hundemodell weiterführen zu können und diese in einer Dissertation zu finalisieren. Vor allem bedanke ich mich für das große Vertrauen, die Unterstützung sowie für den Humor und den Spaß während des gesamten Projektes, in welchem ich viel dazulernen konnte.

Weiterführend möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schröder danken, sich als Gutachter meiner Dissertation von Seiten des Instituts für Biowissenschaften der Universität Rostock zur Verfügung zu stellen.

Ein ganz besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Leukämie und experimentelle Transplantation, die ich mit den Worten „GROSSARTIGES TEAMWORK“ nur loben kann. Wir hatten eine tolle Zeit zusammen sowohl im als auch außerhalb des Labors - die unzähligen schönen und lustigen Momente bei den kulinarischen Weihnachtsfeiern und den abenteuerlichen Laborausflügen.

Danke an den „Schreibraum“ mit Dr. rer. nat. Catrin Roolf, Dr. rer. nat. Sandra Lange, Stephanie Schäfer und Christin Kretzschmar. Mit euch konnte man die eine oder andere fachliche Diskussionen führen und vor allem auftretende Statistik Probleme lösen.

Ein außerordentlicher Dank soll nochmals an Dr. rer. nat. Catrin Roolf und PD Dr. rer. nat. habil. Hugo Murua Escobar gehen, die trotz eines vollen Terminkalenders immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ihr seid echt eine Bereicherung.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich ebenso den „guten Seelen“ des Labors Gudrun Knübel und Anett Sekora für die liebe Zusammenarbeit während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe sagen. Danke Anett für die Unterstützung bei den Transplantaten und der Durchflusszytometrie. Danke Gudrun für die tatkräftige Hilfe mit den Hunden und der Chimärismusanalyse.

Danksagung

Des Weiteren bedanke ich mich bei Roland Gerber für die wunderbare Zeit und die Hilfe bei der Hundebetreuung. War der Stresspegel auch noch so hoch, Zeit für deinen Pfefferminz-Ingwer-Holunderblüten-Tee gab es immer.

Ebenfalls danke ich dem Reimemonster Christin Kretzschmar sowohl für ihre motivierenden Gesänge als auch die schöne Freundschaft, die in dieser Arbeitsgruppe begann.

Darüber hinaus danke ich meinem „Hundebuddy“ Stephanie Schäfer. Trotz der oftmals sehr anstrengenden Zeit und dem Gefühl 24 h pro Tag sind nicht genug, waren wir als Team unschlagbar - getreu dem Motto „survival of the fittest“.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen PC 186.186, der jeden Speichervorgang nach noch so langer Zeit erfolgreich abgeschlossen und bis zur Fertigstellung der Arbeit durchgehalten hat.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinem Schwesterherz Antje dafür, dass ihr immer für mich da seid und mir auch während meiner Promotionszeit mit Rat und Tat zu Seite standet.

Last but not least möchte ich mich bei meinem Freund Andy bedanken, der es jedes Mal aufs Neue schafft, mich mit seinen Späßen und Blödeleien aufzumuntern und dabei nie vergisst, dass wir immer alles zusammen machen müssen :).

10 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 01.02.2016

Juliane Werner

11 ANHANG

Ergänzende Abbildungen

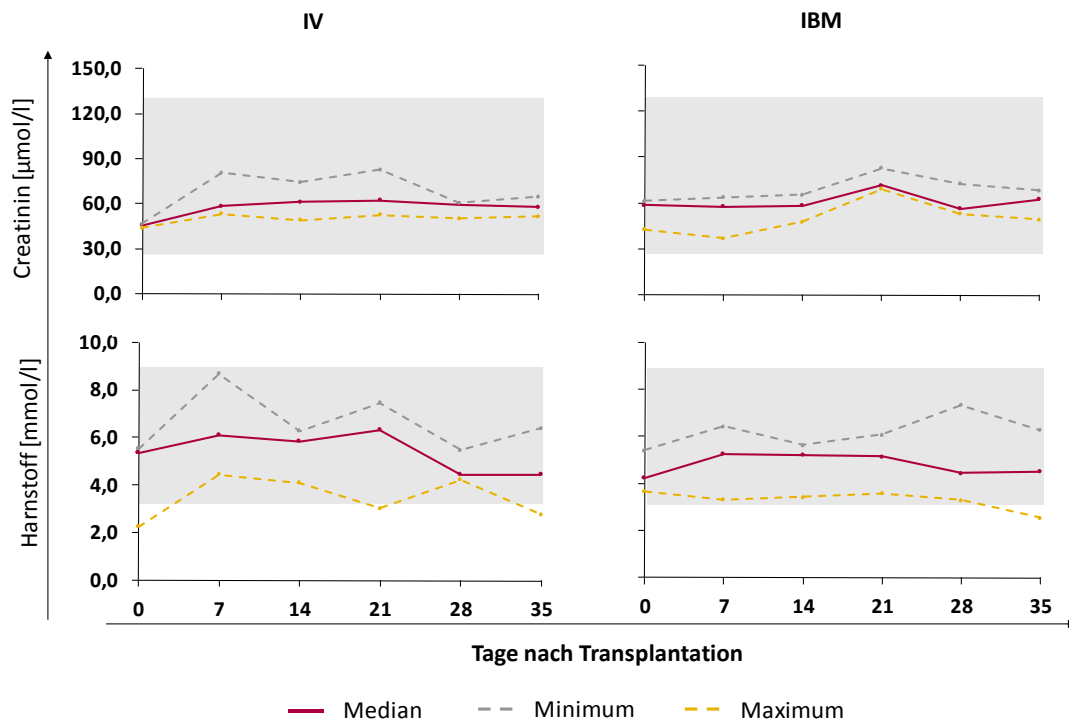


Abbildung 24: Creatinin- und Harnstoffwerte der IV- und IBM-Gruppe in der frühen Posttransplantationsphase

Aufgezeigt ist der mediane Verlauf der untersuchten Niereparameter Creatinin und Harnstoff in der frühen Posttransplantationsphase bis d+35 nach IV- bzw. IBM-HSZT. Die grau markierte Fläche stellt den Normbereich der einzelnen Nierenparameter für Hunde dar. Magenta gekennzeichnete Linien zeigen die medianen Werte der jeweiligen Enzyme an. Die gestrichelten gelben bzw. grauen Linien geben das Minimum bzw. Maximum zum Median wieder.

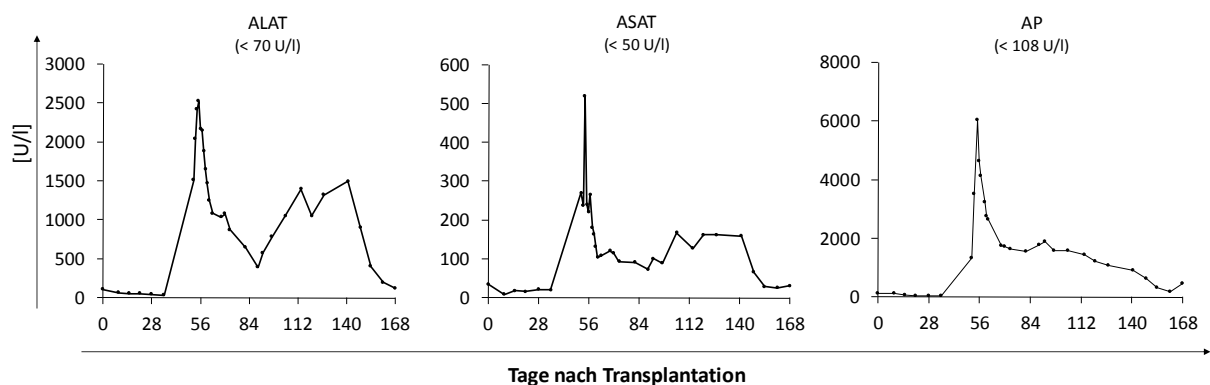


Abbildung 25: Gesamtverlauf von ALAT, ASAT und AP des Hundes mit GvHD-Reaktion

Ein Überblick über den Gesamtverlauf der Leberenzyme ALAT, ASAT und AP vor und nach der GvHD-Reaktion über den Zeitraum von 168 Tagen.

Material

Primer zur Chimärismusbestimmung

Tabelle 18: Liste der verwendeten Forward und Reverse Primer inklusive der Sequenzen (5' zum 3' Ende, Forward Primer ist FAM markiert) für verschiedene canine VNTR-Regionen

Primer	Sequenz	Lokalisation
2634	5' FAM-GAAGAAAGGAAGGAAGAAAAGA-3' 5'-AAAGATTGTCTTGACACGCTG-3'	Chromosom 1
2607	5' FAM-GTTACAGGCCCAAACCCCTCT-3' 5'-CCAACATTCCCACATGTCAG-3'	Chromosom 2
2137	5' FAM-GCAGTCCCTTATTCCAACATG-3' 5'-CCCCAAGTTTTGCATATGTT-3'	Chromosom 3
2146	5' FAM-GGGCTCCACTAAGCACTATCT 3' 5'-TACCATAACAAAGGCAAGGC-3'	Chromosom 3
2319	5' FAM-GGAACACTGTATCCTCAGTGTCC-3' 5'-TGGGAAGGAAGGAAGTGTTG-3'	Chromosom 11
2360	5' FAM-TTACACACACTATTTTGCTGG TCA-3' 5'-CATTGATGCTGAATTTGACTTC-3'	Chromosom 15
2001	5' FAM-TGAACAGAGTTAAGGATAGACACG-3' 5'-TCCTCCTCTTCTTTCCATTGG-3'	Chromosom 23
2609	5' FAM-GGAGTTGAAATGGAAAGAAAGA-3' 5'-TATATTGCTTTGGCCTAAAGGA-3	Chromosom 29
2199	5' FAM-TGTTACAAATTAATGTGAAATGGC-3' 5'-GCTGAGCACTGGGTATTGTAT-3'	Chromosom 31
2611	5' FAM-TGTTAGATGATGCCTTCCTTCT-3' 5'-GAAGCCTATGAGCCAGATCA-3'	Chromosom 36

Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer

Agens	Hersteller
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 0,25 M	Merck
Biocoll-Separationslösung, ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$)	Biochrom AG
Borsäure 0,045 M	Merck
DNA-Längenstandard, Fast Ruler Low range	Fermentas
6x DNA Ladepuffer: (10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA)	Thermo Scientific
dNTP	Pharmacia Biotech
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich
Ethanol 70 %	Universität Rostock, Zentralapotheke
Ethidiumbromid	Stratagene
Formamid p.a. analytical grade	Serva
ILS 600, Längenstandard	Promega
Isopropanol 99,9 %	Universität Rostock, Zentralapotheke
Magnesiumchlorid 25 mM	Fermentas
Natriumchlorid	Merck
PBS 0,01 M	Biochrom AG
Tris Base 0,45 M	Roth

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung

Agens	Herstellung
EDTA Lösung 0,05 mM	9,3 g EDTA + 500 ml Aqua dest.
Erythrozyten-Lysepuffer:	6,68 g NH ₄ Cl + 500 ml Aqua dest
Hundeblut-Separationslösung: ($\rho = 1,074 \text{ g/ml}$)	497,1 ml Biocoll-Separationslösung + 20,9 ml PBS
TBE 0,5 x Puffer:	54 g Tris Base + 27,5 g Borsäure + 200 ml EDTA Lösung (0,05 mM) (auf 10 l auffüllen mit Aqua dest.)

Geräte

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM, 3100 Avant Genetic Analyser	Applied Biosystems
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences
Geldokumentationssystem, E.A.S.Y 1.4 HC	Herolab
Gelelektrophoresekammer, Perfect Blue Maxi S Plus	Peqlab-Biotechnologie GmbH
Linearbeschleuniger, ONCOR Impression	Siemens
Mirkowelle, MW764	Ciatronic
Pipettierhilfe, accu jet pro	Brand
Spektralphotometer, NanoDrop®	Peqlab-Biotechnologie GmbH
Sterilwerkbank, Hera safe	Heraus-Instruments
Thermal Cycler, C1000	Bio-Rad
Wasserbad, Typ 1083	GFL
Vortexer, MS1 Minishaker	IKA
γ-Bestrahlungsanlage, IBL 637	CIS bio international
Zentrifuge, 5418	Eppendorf
Zentrifuge, J6-MI	Beckman Coulter
Zentrifuge, Hettich Rotina 35 R	Hettich

Verbrauchsmaterial

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Eppendorf Reaktionsgefäß (0,2; 0,5; 1,5 ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen (Ø 12 x 75 mm)	Beckton Dickinson
Pasteurpipetten	Roth
Pipettenspitzen (2, 5, 10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Serologische Pipetten (10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Zellsieb Nylon (Ø 100 µm)	Falcon
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One

Antikörper

Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Konjugat	Klon	Isotyp	Firma
<u>Primärantikörper</u>				
anti-canine CD3	FITC	CA17 .2A12	mouse IgG1	AbD Serotec
anti-canine CD4	PE	YKIX 302.9	rat IgG2a	AbD Serotec
anti-canine CD8	PE	YCATE 55.9	rat IgG1	AbD Serotec
anti-human CD14	PE	TÜK4	mouse IgG2a	Miltenyi Biotec
anti-canine CD21	PE	CA2.1D6	mouse IgG1	AbD Serotec
anti-human CD25	FITC	ACT-1	Mouse IgG1	DAKO
anti-canine CD34	PE	1H6	mouse IgG1	AbD Serotec
anti-canine CD45	FITC	YKIX 716.13	mouse IgG2b	AbD Serotec
anti-canine MHC II	FITC	YKIX.334.2	mouse IgG2a	AbD Serotec
<u>Isotypenkontrollen</u>				
anti-mouse	PE	polyklonal	IgG2a	Miltenyi Biotec
anti-rat	PE	polyklonal	IgG2a	AbD Serotec
ant-mouse	FITC	polyklonal	IgG1	AbD Serotec

Kits und Enzyme

Tabelle 24: Übersicht der verwendeten Kits und Enzyme

Agens	Hersteller
DreamTaq Polymerase, 5 U/μl	Fermentas
Dream Taq Puffer 10x	Fermentas
NucleoBond® CB 100	Macherey-Nagel

Medizinprodukte

Tabelle 25: Übersicht über die verwendeten Medizinprodukte

Material	Hersteller
Betasisodona Lösung	Mundipharma
Braunovidon Salbe	BBraun
Citrat-Phosphat-Dextrose-Lösung	Macopharm
Dreiwegehahn mit und ohne Schlauch	BBraun
Fixierbinde (Ø 8 cm)	Elastomull Haft
Heidelberger Verlängerung	BBraun
Heparin Natrium 25 000 I.E./5 ml	Ratiopharm
Intrafix® Safe Set Infusionsgerät	BBraun
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	BBraun
Kanülen (19, 20, 22, 23 G)	BD Microlance
Knochenmarkaspirationsnadel (15 G)	Mandel und Rupp
Kombistopper	BBraun
Kompressen Metallline steril (7,5 x 7,5 cm)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG
Micropore Pflaster weiss (2,50 cm x 9,1 m)	3M Company
Multiadapter	Sarstedt
Multifly-Kanüle mit 200 mm Schlauch (21 G)	Sarstedt
Natrium-EDTA zur Knochenmarkaspiration	Zentralapotheke Rostock
Octeniderm	Schülke & Mayr
Omnifix-F Tuberkulinspritzen	BBraun
Omnifix Perfusor Spritzen (50 ml)	BBraun
S-Monovetten (EDTA, Li-Heparin, Serum, Neutral)	Sarstedt
Spritzen (2, 5, 10, 20 ml)	BBraun
Sterile OP Handschuhe	Protegrity
Teruflex Transferbeutel (150 ml)	Terumo BCT
Transferbeutel 2-fach System	Macopharm
Sangofix® Transfusionsgerät	BBraun
Venenstauer für Kleintiere	Henry Schein
Venenverweilkanüle Vasofix (20, 22 G)	BBraun
Vidisc Augengel	Dr. Mann Pharma
Zelletten Tupfer (5 x 4 cm, Rolle 500)	Lohmann & Rauscher

Medikamente

Tabelle 26: Liste angewendeter Medikamente

Wirkstoff	Hersteller
Amoxicillin-Clavulansäure	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG
Atipamezol	Pfizer
Butorphanol	Intervet Deutschland GmbH
Cerenia	Zoetis Schweiz GmbH
Cyclosporin A	Novartis
Diazepam	Ratiopharm
Enrofloxacin	Bayer
Ketamin	Medistar
Medetomidin	Pfizer
Metamizol	Ratiopharm
Praziquantel/Fenbendazolum	Dr. E. Graeub AG

Referenzwerte der Blut- und Laborparameter

Tabelle 27: Liste der Referenzwerte der Blut- und Laborparameter

Parameter	Referenzwert	SI-Einheit	Parameter	Referenzwert	SI-Einheit
Leukozyten	6,0 - 12,0	[x 10 ⁹ /l]	AP	< 108	[U/l]
Thrombozyten	150 - 500	[x 10 ⁹ /l]	γGT	< 5	γGT
Hämoglobin	7,5 – 12,4	[mmol/l]	Creatinin	27 – 130	[μmol/l]
Hämatokrit	0,44 – 0,57	[l/l]	Harnstoff	3,3 - 9,0	[mmol/l]
Erythrozyten	5,5 – 8,5	[x 10 ⁶ /l]	Cholesterol	3,1 - 10,1	[mmol/l]
MCV	60 – 70	[fl]	Triglycerin	0,29 - 3,88	[mmol/l]
MCH	1,0 -1,6	[fmol]	Natrium	140 – 160	[mmol/l]
MCHC	19,0 – 23,0	[mmol/l]	Kalium	3,5 – 5,1	[mmol/l]
Bilirubin	0,4 – 10	[μmol/l]	Calcium	2,3 – 3,0	[mmol/l]
ALAT	< 70	[U/l]	Phosphat	0,7 – 1,6	[mmol/l]
ASAT	< 50	[U/l]			